

**Enzym- und immunhistochemische Analysen  
des zellulären Knochenmetabolismus  
bei der Osteoporoseinduktion im Tiermodell**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Katharina Brodsky  
aus Ulm

Gießen 2017

Aus dem Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,  
Hand- und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor der Klinik: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Steinmeyer

Tag der Disputation: 27.09.2017

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen</b>	<b>2</b>
2.1 Physiologie des Skelettsystems	2
2.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktionen des Knochens	2
2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens	3
2.1.3 Interzellulärsubstanz und Knochenzellen	6
2.1.4 Funktioneller Knochenumbau	12
2.2 Regulation von Knochenstruktur und Kalziumstoffwechsel	13
2.3 Osteoporose	16
2.3.1 Definition der Osteoporose	16
2.3.2 Stadieneinteilungen	18
2.3.3 Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose	19
2.3.4 Diagnose und Therapie der Osteoporose	20
2.3.5 Osteoporose durch Östrogenmangel (Postmenopause), Multidefizienzdiät und Steroide	23
2.3.6 Osteomalazie – eine wichtige Differenzialdiagnose zur Osteoporose	24
2.4 Fragestellung und Zielsetzung	25
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>26</b>
3.1. Versuchstiere	26
3.2 Tierhaltung und –fütterung	26
3.3 Versuchsanordnung	26
3.4 Operationsablauf	28
3.4.1. Narkose	28
3.4.2 Operation	29
3.4.3 Postoperative Überwachung	30
3.5 Diät und Glukokortikoidgabe	30

3.6 Tötung der Tiere .....	30
3.7 Herstellung der Paraffinschnitte .....	31
3.8 Toluidinblau-Färbung .....	32
3.9 Enzymhistochemie.....	33
3.9.1 Alkalische Phosphatase.....	33
3.9.2 Tartrat-resistente saure Phosphatase.....	34
3.10 Immunhistochemie.....	35
3.10.1 Immunhistochemische Färbung knochenanaboler Proteine.....	38
3.10.2 Immunhistochemische Färbung knochenkataboler Proteine.....	39
3.11 Auswertung der Enzymhistochemie .....	39
3.11.1 Deskriptive Auswertung .....	40
3.11.2 Semiautomatisierte Auswertung mit ImageJ .....	40
3.12 Auswertung der Immunhistochemie .....	42
3.12.1 Deskriptive Auswertung .....	42
3.12.2 Semiautomatisierte Auswertung mit GIMP und ImageJ .....	42
3.13 Statistische Auswertung.....	43
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
4.1 Minderung der Knochenqualität durch Multidefizienzdiät oder Steroidbehandlung .....	44
4.2 Zelluläres Ungleichgewicht durch Ansprechen der Behandlung.....	47
4.2.1 Erhöhte Osteoblastenaktivität durch Multidefizienzdiät und Steroide .....	47
4.2.2 Erhöhte Osteoklastenaktivität und reduzierte Trabekeloberfläche durch Multidefizienzdiät und Steroide.....	49
4.3 Veränderter Knochenanabolismus durch Langzeitdiät .....	52
4.3.1 Biglycan.....	52
4.3.2 Fibronectin .....	55
4.3.3 Osteocalcin.....	57
4.3.4 Tenascin C .....	59
4.4 Geringfügiger Einfluss der Langzeitdiät auf den Knochenkatabolismus .....	61
4.4.1 Carboanhydrase 2.....	61

4.4.2 MMP-9.....	64
4.4.3 MMP-14.....	66
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>69</b>
5.1 Die Ratte als Kleintiermodell für die Osteoporoseinduktion .....	70
5.2 Semiautomatisierte histomorphometrische Auswertung .....	73
5.3 Kurzzeitbehandlung als Modell einer postmenopausalen Osteoporose.....	74
5.4 Langzeitbehandlung als Modell einer senilen Osteoporose.....	83
5.5 Modell einer steroidinduzierten, sekundären Osteoporose .....	88
5.6 Betrachtung Studiendesign, Methodik und Ergebnisse .....	92
<b>6. Ausblick .....</b>	<b>94</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>96</b>
<b>Summary.....</b>	<b>98</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>103</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>104</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>105</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung.....</b>	<b>115</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>116</b>

## 1. Einleitung

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die zunehmend in unserer alternden Gesellschaft an Bedeutung gewinnt. Immer mehr Menschen leiden unter den Folgen der mit der Osteoporose einhergehenden Knochenbrüchigkeit und der daraus resultierenden Frakturanfälligkeit. Es wird je nach Literatur vermutet, dass in der weißen Bevölkerung 40-50% der Frauen und 13-20% der Männer über 50 Jahre in ihrem weiteren Leben eine Osteoporose-assoziierte Fraktur erleiden werden (Sambrook & Cooper 2006; Kanis et al. 2000; Melton et al. 2005; World Health Organization 2003). Es kommt zu Schmerzen, starken Einschränkungen der Mobilität und Selbstständigkeit der betroffenen Patienten sowie teilweise zu Angst, Verlust der Selbstachtung und Depressionen, was eine reduzierte Lebensqualität zur Folge hat (Bartl & Gradinger 2009; Reid 2011). Allein in Deutschland verursachen die Folgen osteoporotischer Frakturen jährlich Kosten in Milliardenhöhe, die gemäß der Bone Evaluation Study (BEST) 2009 bei ca. 4,5 Milliarden Euro lagen (Klein et al. 2014) und mit zunehmend höherer Lebenserwartung weiter steigen werden (Bartl & Gradinger 2009).

Man hat zwar in den vergangenen Jahren einiges über die Epidemiologie, Pathogenese und Therapie der Osteoporose herausgefunden, allerdings bestehen weiterhin große Defizite im Wissen um die Pathophysiologie der unterschiedlichen Osteoporoseformen sowie die diagnostischen und therapeutischen Optionen.

Nach aktuellem Kenntnisstand beschränkt sich die Osteoporose bzw. der altersabhängige Knochenmassenverlust auf den Menschen und Affen (Black et al. 2001; Egermann et al. 2005; Cerroni et al. 2000).

Es wurde bislang mehrfach in verschiedenen experimentellen Studien versucht, mit Hilfe von Ovariectomie, Ovariohysterektomie, Kalzium- und Vitamin D-reduzierter Diät, Medikamenten und Immobilisation einen osteoporotischen Knochenstatus im Tiermodell zu erzeugen. Bis heute gibt es jedoch kein definitiv etabliertes und standardisiertes Tiermodell, das dem humanen osteoporotischen Knochenstatus sowohl anatomisch als auch hormonell entspricht (Egermann et al. 2005). Eine Ovariectomie alleine kann keinen mit dem menschlichen osteoporotischen Knochen vergleichbaren Knochendichteverlust verursachen (Egermann et al. 2005), weshalb eine Kombination operativer, hormoneller, diätetischer und medikamentöser Maßnahmen notwendig scheint.

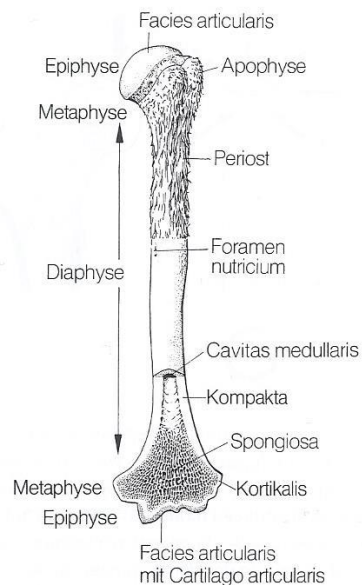
## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Physiologie des Skelettsystems

#### 2.1.1 Makroskopischer Aufbau und Funktionen des Knochens

Das Knochengewebe ist ein besonders hartes Bindegewebe, das zusammen mit dem Knorpelgewebe eine Stützfunktion ausübt und mit den Gelenken und Bändern den passiven Bewegungsapparat bildet. Darüber hinaus dient es teilweise als Schutzhülle für wichtige Organe, wie beispielsweise das Gehirn, hat als Kalziumreservoir metabolische Funktionen und beinhaltet das blutbildende Knochenmark. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Knochen können ganz verschiedene Formen haben. So findet man zum Beispiel an den Extremitäten überwiegend Röhrenknochen (*Ossa longa*), die aus einem Schaft (Diaphyse) mit verbreiterten Enden (Epiphysen) bestehen (Abbildung 1=Abb. 1). Letztere tragen die Gelenkflächen und –knorpel (*Facies articularis* und *Cartilago articularis*). (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Schiebler 2005)



**Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau eines Röhrenknochens.**

Die Epiphysen sind die Endstücke der Röhrenknochen, bestehen aus Spongiosa, umhüllt von einer Kortikalis und bilden die Gelenkflächen. Den Übergang zur Diaphyse bilden die Metaphysen, wo auch die Apophysen als Ansatzpunkte für Muskeln und Bänder gelegen sind. Die Außenwand der Diaphyse besteht aus Kompakta und umgibt die Cavitas medullaris (Markhöhle). Der Knochen ist von Periost umgeben, wo sich auch die Foramina nutriticia zur Gefäßversorgung des Knochenmarks befinden. (Schiebler 2005)

Zwischen Epi- und Diaphyse liegt die sogenannte Metaphyse. An der Metaphyse sind Vorsprünge zur Befestigung von Muskeln, Sehnen und Bändern zu finden, die

Apophyse genannt werden (Schiebler 2005). Zwischen Epi- und Metaphyse der Röhrenknochen liegt die Epiphysenfuge. Dort findet das Längenwachstum der Röhrenknochen statt nach dessen Abschluss sie verknöchert. Des Weiteren gibt es auch noch kurze Knochen (*Ossa brevia*, v.a. Handwurzel-/Fußwurzelknochen), platte Knochen (*Ossa plana*, z.B. Schulterblatt, Schädelknochen) und unregelmäßig geformte Knochen (*Ossa irregularia*) wie die Wirbel, die aus dem Wirbelkörper und dem Wirbelbogen mit Fortsätzen bestehen. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Schiebler 2005)

Der Großteil der Knochen (Epi- und Metaphysen der Röhrenknochen sowie alle anderen Knochen) besteht aus *Substantia spongiosa*, einem Gerüst aus Knochenbälkchen/-trabekeln. In den Zwischenräumen der Spongiosa befindet sich blutbildendes, rotes Knochenmark (*Medulla ossium rubra*). Die Diaphyse der Röhrenknochen und die Außenwand aller Knochen bestehen dahingegen aus kompaktem Knochengewebe (*Substantia compacta*), wobei die Außenwand Kortikalis (*Substantia corticalis*) genannt wird. Die Markhöhle (*Cavitas medullaris*) der Diaphysen enthält mit Fettgewebe gefülltes, gelbes Knochenmark (*Medulla ossium flava*). Nach außen sind die Knochen von Periost (Knochenhaut), bestehend aus dem *Stratum osteogenicum* und *Stratum fibrosum*, überzogen. Im Periost befinden sich *Foramina nutritia*, durch die die *Vasa nutritia* in das Knochenmark gelangen und somit dessen Gefäßversorgung sichern können. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Schiebler 2005)

### 2.1.2 Mikroskopischer Aufbau des Knochens

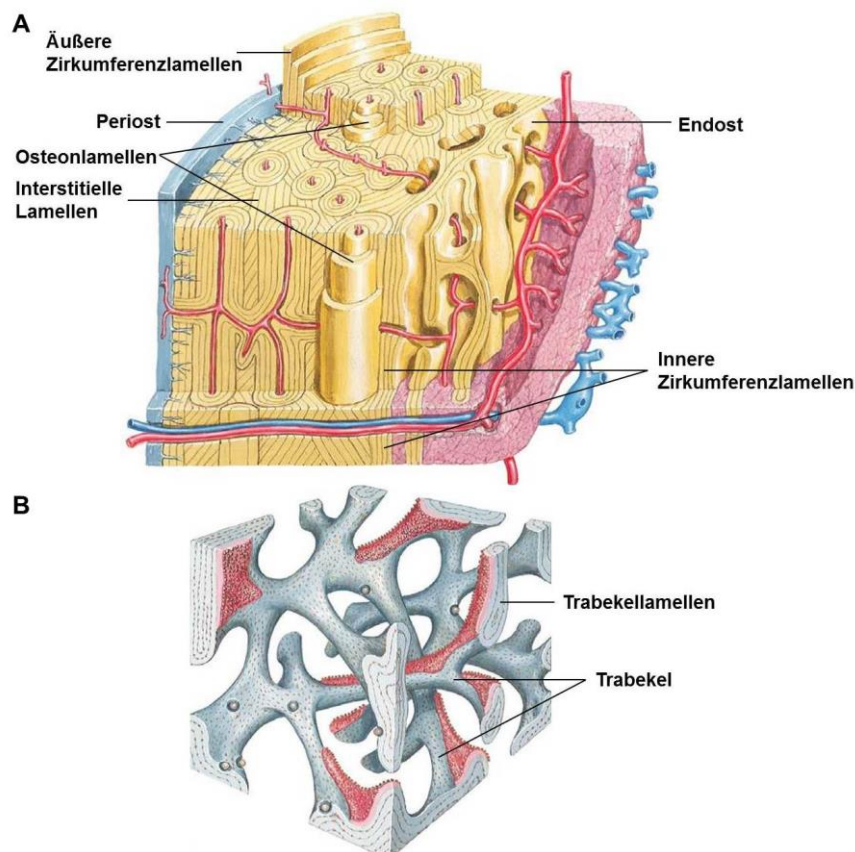
Knochen zeichnen sich einerseits durch Härte und andererseits durch Elastizität aus. Diese Eigenschaften sind jeweils durch die Zusammensetzung der Knochenmatrix bedingt. Die Härte und Druckfestigkeit werden durch die enthaltenen Kalziumphosphat-Kristalle (Hydroxylapatit) hervorgerufen, wohingegen die Elastizität und Zugfestigkeit durch die trajektoriell ausgerichteten Kollagenfibrillen entstehen. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Kompakter Knochen ist nur in der Außenschicht zu finden (*Substantia compacta*, *Substantia corticalis*) und macht 80% des Knochengewebes aus. Die Kortikalis kann zwischen 0,5 und 3 mm dick sein. Der spongiöse Knochen besteht aus einem Geflecht von Knochenstrabekeln (mittlere Dicke 0,2  $\mu\text{m}$ ), die in Richtung der Druck- und Zugspannungen des jeweiligen Knochens ausgerichtet sind (trajektorielle Anordnung). Die Oberfläche der Spongiosa ist von Endost, bestehend aus endostalen Saumzellen und einer dünnen Extrazellulärmatrix (EZM), bedeckt und misst 11  $\text{m}^2$ . Dahingegen macht die Oberfläche des kompakten Knochens (innen Endost, außen Periost) nur 1  $\text{m}^2$  aus. Das *Stratum osteogenicum* des Periosts liegt innen, ist zellreich und beinhaltet



osteogene und chondrogene Vorläuferzellen. Das Stratum fibrosum bildet die äußere Schicht, die aus straffem, kollagenem Bindegewebe besteht. Das Periost ist über Sharpey-Fasern, Bündel von Kollagenfibrillen, die in das Kollagenfibrillensystem der Kortikalis reichen, fest mit dem Knochen verbunden. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Knochengewebe kommt entweder in Form von Lamellen- oder als Geflechtknochen vor. Der Lamellenknochen überwiegt im adulten Organismus, wohingegen man Geflechtknochen während des Knochenwachstums sowie bei der Frakturheilung finden kann. Im Geflechtknochen (Faserknochen) bilden die Kollagenfasern ein Flechtwerk ohne jegliche Organisation. Lamellenknochen kann als kompakter und als spongiöser Knochen auftreten. Er besteht aus Knochenlamellen, in denen die Kollagenfibrillen parallel, meist schräg zur Längsachse, angeordnet sind. Die Kollagenfibrillen benachbarter Knochenlamellen stehen meist senkrecht zueinander. Knochenlamellen können verschieden angeordnet sein: als Osteonlamellen (Speziallamellen), Zirkumferenzlamellen (Generallamellen), Interstitielle Lamellen (Schaltlamellen) oder Trabekellamellen (Abb. 2). (Benninghoff & Drenckhahn 2008)



**Abbildung 2: Knochenaufbau des kompakten und spongiösen Knochens.**

A) Kortikaler, kompakter Knochen mit äußeren und inneren Zirkumferenzlamellen, die parallel an der äußeren bzw. inneren Knochenhaut (Periost, Endost) liegen, um Gefäße angeordneten Osteonlamellen sowie interstitiellen Lamellen als Überreste abgebauter Osteone.

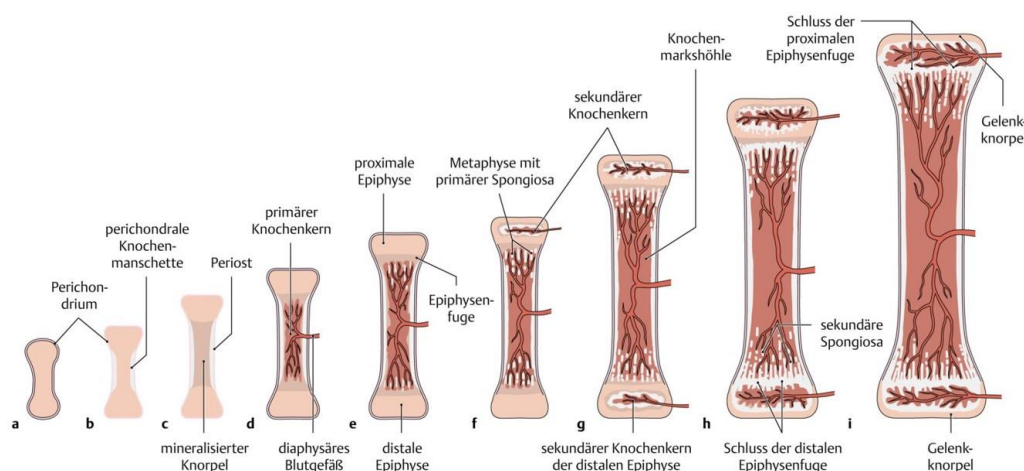
B) Spongiöser, trabekulärer Knochen mit Trabekellamellen, die meist paketartig angeordnet sind, seltener findet man Osteone. (Benninghoff, Drenckhahn 2008; Greene, Netter 2006)

Osteonlamellen/Osteone sind vor allem im kompakten Knochen zu finden, seltener im spongiösen. Ein Osteon besteht aus ca. 30 konzentrischen Knochenlamellen, in deren Mitte ein zentraler Gefäß- und Nervenkanal, der Havers-Kanal, verläuft. Volkmann-Kanäle verbinden die Havers-Kanäle verschiedener Osteone quer miteinander. In den Lamellen der Osteone liegen Osteozyten-Lakunen, in denen die Zellkörper der Osteozyten liegen. Deren Zellfortsätze ragen in Canaliculi ossei, Knochenkanälchen, und sind darüber mit den Nachbarosteozyten sowie mit den Havers-Kanälen vernetzt. Interstitielle Lamellen sind Überreste unvollständig abgebauter, alter Osteone oder Zirkumferenzlamellen und liegen zwischen Osteonen. Zirkumferenzlamellen liegen an der periostalen und endostalen Oberfläche der Kompakta, sind nicht wie die Osteonlamellen um Blutgefäße orientiert, sondern oberflächenparallel angeordnet. Die Trabekellamellen sind meist halbmondförmig, paketartig angeordnet und füllen ehemalige Erosionslakunen aus. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

### **Knochenbildung**

Knochengewebe kann entweder entstehen, indem sich Mesenchymzellen direkt zu Osteoblasten entwickeln (desmale Ossifikation) wie beispielsweise beim Schädeldach, dem Gesichtsschädel sowie der Klavikula oder indem sie zunächst zu Chondroblasten werden, die ein Knorpelmodell des Knochens bilden, das sekundär ossifiziert (chondrale Ossifikation) wie beim übrigen Skelett. Bei der chondralen Ossifikation wird entweder das Knorpel- in Knochengewebe umgewandelt (enchondrale Osteogenese) oder es wird Knochengewebe auf die Knorpeloberfläche aufgelagert (perichondrale Osteogenese) (Abb. 3). Das Längenwachstum der Röhrenknochen erfolgt durch enchondrale, das Dickenwachstum durch perichondrale Verknöcherung. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Welsch & Deller 2010)

□

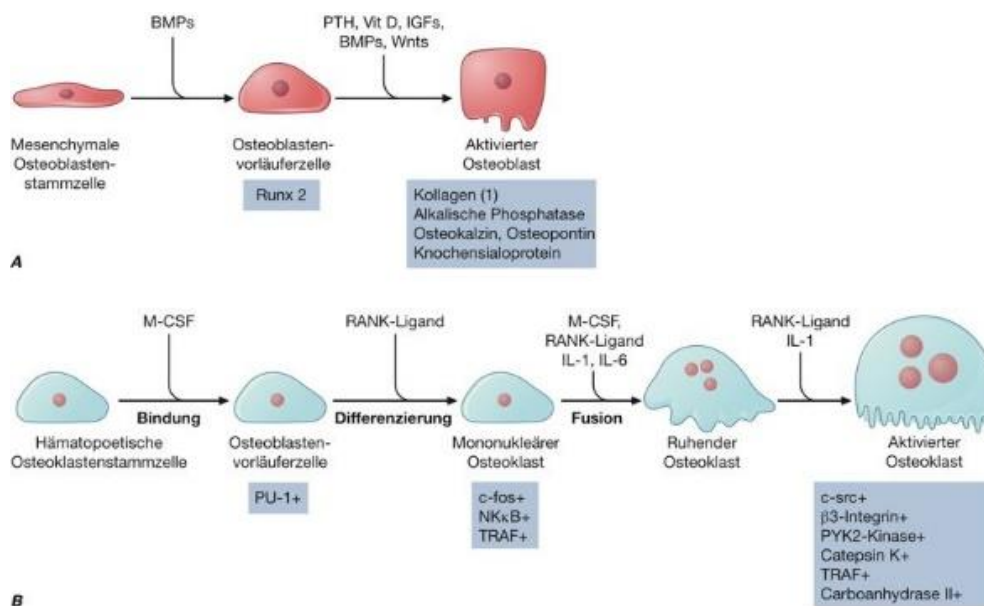


**Abbildung 3: Entwicklung eines Röhrenknochens durch chondrale Ossifikation (Schünke et al. 2007).**

### 2.1.3 Interzellulärsubstanz und Knochenzellen

Die Knochenmatrix enthält 10-20% Wasser, der Rest setzt sich zu 70% aus anorganischen und zu 30% aus organischen Substanzen zusammen. Die anorganische Mineralsubstanz besteht zum Großteil aus Hydroxylapatit-Kristallen und zu kleineren Teilen aus Kalziumcarbonat und Kalziumhydrogenphosphat. Des Weiteren enthält die extrazelluläre Matrix (EZM) auch geringe Mengen an Fluor, Ziträt, Magnesium, Eisen, Zink, Kupfer, Strontium und Blei. Der organische Teil der Knochenmatrix besteht zu 90% aus Kollagen Typ I und zu 10% aus verschiedenen Proteinen wie z.B. Kollagen V, Osteocalcin, Osteonectin, Osteopontin, Proteoglykane, Fibronectin, etc. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Zu den spezifischen Knochenzellen zählen Osteoblasten, Osteozyten, endostale Saumzellen und Osteoklasten. Osteoblasten, Osteozyten und endostale Saumzellen entstehen aus mesenchymalen Vorläuferzellen, sogenannten Osteoprogenitorzellen. Dahingegen gehören Osteoklasten dem mononukleären Phagozytensystem an (Abb. 4). (Benninghoff & Drenckhahn 2008)



**Abbildung 4: Entstehung von Osteoblasten und Osteoklasten.**

A) Entstehung von Osteoblasten aus mesenchymalen Stammzellen. B) Entstehung von Osteoklasten aus mononukleären Vorläuferzellen.

Die Differenzierung und Proliferation wird jeweils durch verschiedene Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst, wie bei den Osteoblasten zum Beispiel durch Parathormon und Vitamin D sowie bei den Osteoklasten beispielsweise durch RANKL und M-CSF (siehe jeweils oberhalb der Pfeile). Unterhalb der Pfeile stehen für die entsprechenden Entwicklungsstufen typische Marker oder Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise die alkalische Phosphatase für aktive Osteoblasten oder Carboanhydrase II für aktivierte Osteoklasten. (Harrisons Innere Medizin 2012)

## **Knochenaufbau**

### **(Osteoanabole EZM-Proteine, Osteoblasten, Osteozyten, Endostale Saumzellen)**

Eine entscheidende Rolle beim Knochenaufbau spielen die Osteoblasten, da sie Osteoid bilden. Osteoid ist die noch nicht mineralisierte Knochengrundsubstanz, die aus Kollagen Typ I sowie weiteren osteoanabolen EZM-Proteinen wie Proteoglykanen, Fibronectin und Osteocalcin besteht. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Zu den *osteoanabolen EZM-Proteinen* gehören die Proteoglykane wie beispielsweise Osteoadherin sowie die kleinen leucinreichen Proteoglykane Biglycan, Decorin und Fibromodulin. Biglycan (BGN) und Decorin inhibieren die Mineralisierung und spielen eine entscheidende Rolle bei der Kollagenfibrillogenese sowie wahrscheinlich auch bei der räumlichen Ausrichtung und Stabilisierung der Kollagenfibrillen. Biglycan tritt überwiegend perizellulär sowie auf der Zelloberfläche auf, bindet an Kollagen I, II sowie an elastische Fasern und kann trophische Signale auf Zellen vermitteln (Bianco et al. 1990). Osteoadherin hingegen fördert die Matrixhaftung der Osteoblasten, da es an Hydroxylapatit und über  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin an Osteoblasten bindet. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Chen et al. 2004)

Fibronectin (FBN) ist ein ubiquitär vorkommendes Matrixglykoprotein. Es ermöglicht durch Integrinbindungsstellen eine Adhäsion der Zellen an Matrixkomponenten wie Kollagen, Fibrin und Proteoglykane. Das von Osteoblasten produzierte Osteonectin ähnelt Fibronectin und ist über Integrine mit den Knochenzellen verbunden. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Welsch & Deller 2010)

Osteocalcin (OCN) ist ein von Osteoblasten produziertes Glykoprotein, das vermehrt in Anwesenheit von 1,25-Dihydro-Vitamin-D3 (Calcitriol) gebildet wird und auch unter dem Namen bone  $\gamma$ -carboxylglutamic acid-containing protein oder BGP bekannt ist (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Poser et al. 1980; Hauschka et al. 1989). Es besitzt drei  $\gamma$ -Carboxyl-Glutaminsäuregruppen (GIA), die Vitamin-K-abhängig angehängt werden. Aufgrund dieser Gruppen ist Osteocalcin ein extrem saures Protein (Benninghoff & Drenckhahn 2008). Es ist Bestandteil der nicht-kollagenen Knochenmatrix, bindet an Hydroxylapatit und Kalzium und inhibiert die Mineralisierung des Knochens. Des Weiteren spielt Osteocalcin eine Rolle im Knochenumbau durch Beeinflussung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität. (Hauschka et al. 1989; Poser et al. 1980; Duque & Watanabe 2011; Neve et al. 2013; Ishida & Amano 2004; Ducy et al. 1996)

Tenascine sind EZM-Glykoproteine, von denen es verschiedene Formen gibt (C, R, W, X, Y). Tenascin C (TNC) wird von Osteoblasten gebildet, ist insbesondere in Sehnen und im Periost zu finden und wird während der Embryonalentwicklung nahezu überall

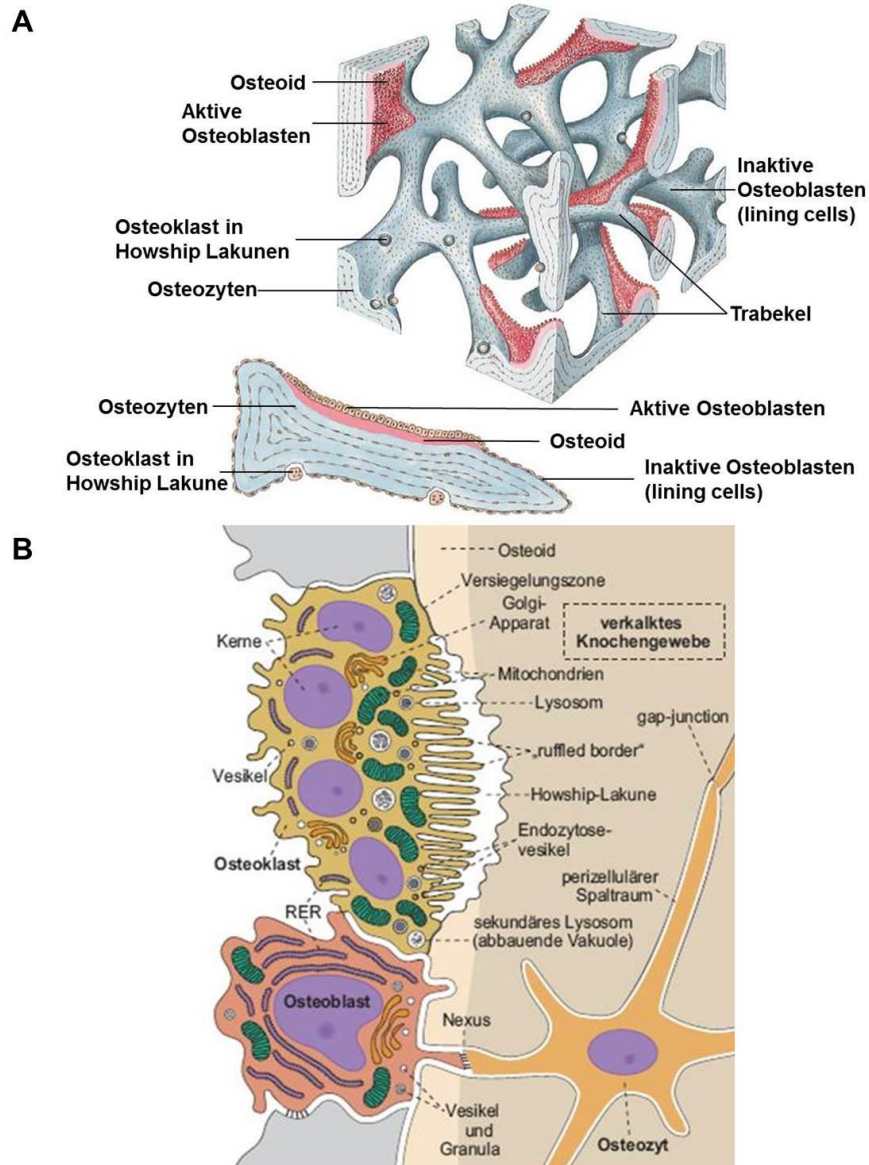
exprimiert. Tenascin C ist vermehrt unter pathologischen Umständen nachweisbar (Wunden, Tumore) und die Expression wird durch mechanische Beanspruchung gefördert (Chiquet-Ehrismann & Chiquet 2003; Chiquet et al. 2004; Zhang et al. 2008). Tenascine können an Heparansulfatseitenketten von Proteoglykanen sowie an Integrine der Zelloberfläche binden, wodurch sie andere Adhäsionsproteine teilweise verdrängen (Minuth et al. 2012). Aufgrund dieser partiell antiadhäsiven Funktion können sie die Zellmigration im Bindegewebe erleichtern. (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2004; Heine 2014; Chiquet-Ehrismann et al. 1986)

*Osteoblasten* bilden die organischen Matrixkomponenten des Knochens, das Osteoid. Sie sind basophile, kubische, einkernige Zellen, deren Zellmembran reich an alkalischer Phosphatase (=ALP) ist, die als Kennmolekül der Osteoblastendifferenzierung gilt. Die alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten freigesetzt, um die Mineralisierung einzuleiten. Sie kann verschiedene Phosphatverbindungen von Proteinen, Nukleinsäuren, etc. hydrolysieren und dabei anorganisches Phosphat freisetzen. Es konnte gezeigt werden, dass ALP und andere hydrolytische Enzyme eine wichtige Rolle in der Phosphat-Homöostase spielen und die Mineralisierung der Matrix kontrollieren. Weiterhin liefert ALP wahrscheinlich zusätzlich an Kalzium bindendes Phosphat für die Bildung von Hydroxylapatit. Pyrophosphat gilt als Inhibitor der Hydroxylapatit-Bildung und kann durch ALP gespalten werden. Bei ALP-Mangel kommt es daher zu einem erhöhten Anteil an Pyrophosphat und somit zu verminderter Hydroxylapatit-Ablagerung. Es entsteht eine Hypophosphatasie. (Balcerzak et al. 2003; Hesse et al. 2002; Orimo & Shimada 2008; Hui & Tenenbaum 1998; Benninghoff & Drenckhahn 2008; Narisawa et al. 1997)

Osteoblasten reihen sich an der Osteoidgrenze nebeneinander auf und bilden so einen palisadenartigen Zellrasen (Abb. 5A). Aufgrund der ausgeprägten Proteinsynthese enthalten sie viele Ribosomen sowie reichlich raues Endoplasmatisches Retikulum (raues ER, Basophilie) und einen großen Golgi-Apparat (Abb. 5B). Sie sezernieren Kollagen, Proteoglykane, Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin etc. Sie besitzen als einzige Knochenzellen Rezeptoren für Parathormon (PTH), wodurch sie auch eine wichtige Rolle beim Knochenabbau spielen. Des Weiteren haben Osteoblasten Rezeptoren für 1,25-Dihydro-Vitamin-D3 (Calcitriol) und Retinsäure (aktives Vitamin A). Sie synthetisieren auch verschiedene Zytokine (z.B. Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Insulin-like Growth Factors (IGF-I, IGF-II), die autokrin wirken und zu vermehrter Proliferation von Osteoblasten sowie zu gesteigerter Osteoidbildung führen. Andererseits stimulieren und aktivieren sie mit Hilfe anderer Zytokine (z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine (IL-1, IL-6, IL-11)) auch parakrin Osteoklasten und induzieren deren Differenzierung. Osteoblasten mit geringerer oder



fehlender ALP-Aktivität werden als osteozytäre Osteoblasten bezeichnet. Deren Zellfortsätze ragen in die Knochenkanälchen hinein und stehen mit den Osteozyten in Verbindung. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)



**Abbildung 5: Lokalisation und Zusammenspiel der verschiedenen Knochenzellen.**

A) Knochen trabekel mit Knochenzellen: Aktive Osteoblasten produzieren Osteoid, während sich inaktive Osteoblasten als lining cells auf der Trabekeloberfläche befinden und Osteozyten bereits in der verkalkten Knochenmatrix eingemauert wurden. Osteoklasten bauen Knochen ab und fressen dabei in die Trabekeloberfläche sogenannte Howship-Lakunen. (Greene, Netter 2006; Netter, Böttcher 2001)

B) Detailansicht Knochenzellen: Der Osteoblast mit viel rauem ER, einem großen Golgi-Apparat und vielen Vesikeln produziert Osteoid. Er ist über Gap Junctions/Nexus mit Osteozyten verbunden, deren Zellfortsätze in den Knochenkanälchen liegen und untereinander über Gap Junctions verbunden sind. Der multinukleäre Osteoklast baut Knochen ab, wodurch Howship-Lakunen entstehen, die über Versiegelungszonen von der Umgebung abgegrenzt sind. An der der Matrix zugewandten Seite erkennt man die „ruffled boarder“ sowie zahlreiche Endozytosevesikel. (Greene, Netter 2006; Netter, Böttcher 2001; Welsch, Deller 2010)

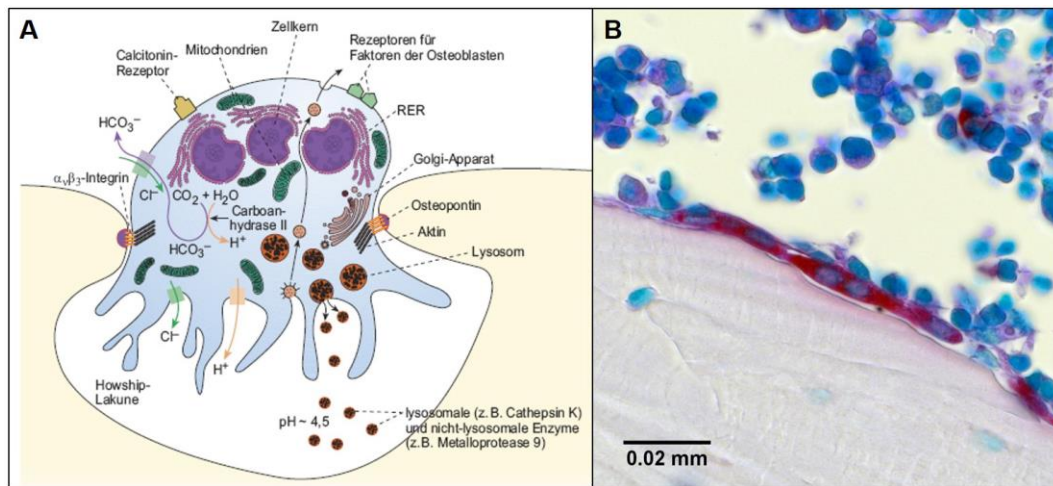
*Osteozyten* sind inaktive Osteoblasten, die in die verkalkte Knochensubstanz eingemauert wurden, in Osteozyten-Lakunen liegen und von einem schmalen Saum unverkalkter Knochenmatrix (perizellulärer Raum) umgeben sind (Abb. 5). Die Zellfortsätze der Osteozyten liegen in Canaliculi ossei, in Knochenkanälchen, und sind durch Gap Junctions, Zell-Zell-Kontakte, früher auch Nexus genannt, untereinander vernetzt. Auf diesem Wege können Signale zwischen den blutgefäßnahen und -fernen Osteozyten sowie auch zu den Osteoblasten weitergeleitet und die metabolische Aktivität koordiniert werden. Daher gelten Osteozyten als Mechanosensoren. Wahrscheinlich können sie wieder zu aktiven Osteoblasten werden, wenn sie nach Knochenresorption nicht mehr eingemauert sind. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

*Endostale Saumzellen* (Bone Lining Cells) sind ruhende Osteoblasten. Sie liegen auf den Trabekeln (Abb. 5A), der inneren Oberfläche der Kortikalis sowie an der Wand der Havers-Kanäle. Sie sind flach, haben einen platten Zellkern und sind mit Osteozyten sowie untereinander über Gap Junctions verbunden. Wahrscheinlich sind endostale Saumzellen an der Regulation der Knochenresorption beteiligt, da Osteoklasten die Lining Cells passieren müssen, um an die Knochenmatrix zu gelangen. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass sie Kollagenase sezernieren und so den Matrixsaum für die Osteoklasten vorbereiten können. (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

### ***Knochenabbau (Osteokatabole EZM-Proteine, Osteoklasten)***

Osteoklasten sind entscheidend am Knochenabbau beteiligt, da sie mithilfe verschiedener Enzyme, die sie selbst synthetisieren und sezernieren, in der Lage sind, die mineralisierte Knochenmatrix abzubauen. Diese Enzyme werden als osteokatabole EZM-Proteine bezeichnet. Die Aktivität der Osteoklasten und somit der Knochenabbau generell unterliegt unter anderem der Kontrolle von Osteoblasten. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)

*Osteoklasten* sind für den Abbau der mineralisierten Knochenmatrix und somit auch die Kalziumfreisetzung zuständig. Osteoklasten sind multinukleäre, azidophile Riesenzellen (bis zu 25 Zellkerne) (Abb. 6B). Sie entstehen durch Fusion mehrerer einkerniger Vorläuferzellen aus dem monozytären Phagozytensystem. Aktive Osteoklasten liegen direkt auf der mineralisierten Knochenmatrix und fressen Bohrkänäle in die Kompakta sowie Erosionslakunen (Howship-Lakunen) in die Trabekeloberflächen der Spongiosa. Sie haben an ihrer der Matrix zugewandten Seite zur Vergrößerung der Oberfläche einen Faltensaum („ruffled boarder“), der dem Endosomen-Lysosomen-Apparat entstammt und sich daher häufig durch Endo-/Exozytose verändert (Abb. 5B, 6A). (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Wennemuth & Albrecht 2012)



**Abbildung 6: Osteoklast.**

A) An der „ruffled boarder“ des aktiven Osteoklasten wird Salzsäure in die Howship-Lakune gepumpt zur Auflösung der Kalzium-Verbindungen sowie anschliessend lysosomale und nicht-lysosomale Enzyme zum Abbau der organischen Knochenmatrix. Die Howship-Lakune wird mithilfe von  $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen und Aktinfilamenten abgesichert und stabilisiert. (Welsch, Deller 2010) B) TRAP-positiver, polynukleärer Osteoklast auf der Trabekeloberfläche (Labor für experimentelle Unfallchirurgie, Gießen).

Zu den *osteokatabolen EZM-Proteinen* gehören beispielsweise die Carboanhydrase 2 sowie Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Osteoklasten sind reich an Carboanhydrase 2 (CA2), die die Bildung von  $H^+$  und  $HCO_3^-$  aus  $CO_2$  und  $H_2O$  katalysiert. Die Zellmembran beinhaltet eine  $H^+$ -ATPase, die Protonen in die Howship-Lakune pumpt (Abb. 6A). Dadurch entsteht dort Salzsäure, die für einen pH von ca. 4,5 sorgt, was zur Auflösung der Knochensalze beiträgt. Um diesen Bereich von der Umgebung abzuschirmen, gibt es eine gürtelförmige Versiegelungszone, in der die Zellmembran insbesondere über  $\alpha_v\beta_3$ -Integrine mit der Matrix (v.a. Osteopontin) verbunden ist. Diese Zone wird durch Aktinfilamente stabilisiert. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Welsch & Deller 2010)

Osteoklasten haben mehrere Golgi-Apparate, ein gut entwickeltes raues ER und sind reich an Mitochondrien (Azidophilie), Lysosomen und Vakuolen (Abb. 6A). Ein Osteoklast ist ca. 2 Wochen aktiv und geht dann entweder in Apoptose über oder in den Ruhestand zurück. Die Osteoblasten steuern die Aktivierung und Entstehung von Osteoklasten. Aktive Osteoklasten arbeiten nach folgendem Prinzip: Zunächst werden durch das saure Milieu die Kalzium-Verbindungen aufgelöst, dann sezernieren Osteoklasten lysosomale Enzyme wie beispielsweise Cathepsin K und die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) sowie nicht-lysosomale Proteasen (z.B. MMPs), die die organische Matrix zerlegen. Abschließend werden die Fragmente der EZM durch Endozytose aufgenommen und durch Transzytose an der der Matrix abgewandten Seite des Osteoklasten wieder abgegeben. TRAP gilt als Marker des



Knochenumsatzes, insbesondere der Resorption, und somit auch der Osteoklastenaktivität (Scarnecchia et al. 1991; Janckila et al. 2001). (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)

MMPs sind Enzyme, die die EZM-Moleküle abbauen. Die meisten MMPs sind Proenzyme und werden extrazellulär durch Spaltung zu aktiven Proteasen konvertiert. In ihrem aktiven Zentrum befindet sich Zink und sie benötigen Kalziumionen für ihre Strukturstabilität. Zu der Familie der Zink-bindenden Metalloproteinasen gehören 20 verschiedene Enzyme, darunter auch MMP-9 und MMP-14. MMP-9, auch Gelatinase B genannt, wird von Osteoklasten gebildet und ist zusammen mit anderen Enzymen wie Cathepsin K am Abbau der EZM beteiligt. MMP-14 wird auch MT1-MMP (membrane type MMP) genannt, da diese membrangebunden auf Osteoklasten im Bereich der Haftzonen vorkommt. Durch perizelluläre Proteolyse von EZM-Bestandteilen, insbesondere Kollagen Typ I, spielt sie eine wichtige Rolle bei der Bildung von Knochenkanälchen und somit bei der Vernetzung von Osteozyten untereinander (Holmbeck et al. 1999; Holmbeck et al. 2005). Bei Fehlen von MMP-14 kommt es beispielsweise bei Mäusen zu schweren Skelettanomalien. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Welsch & Deller 2010; Wennemuth & Albrecht 2012; Neve et al. 2013; Hill et al. 1994; Sternlicht & Werb 2001; Stöcker et al. 1995; Murphy & Nagase 2008)

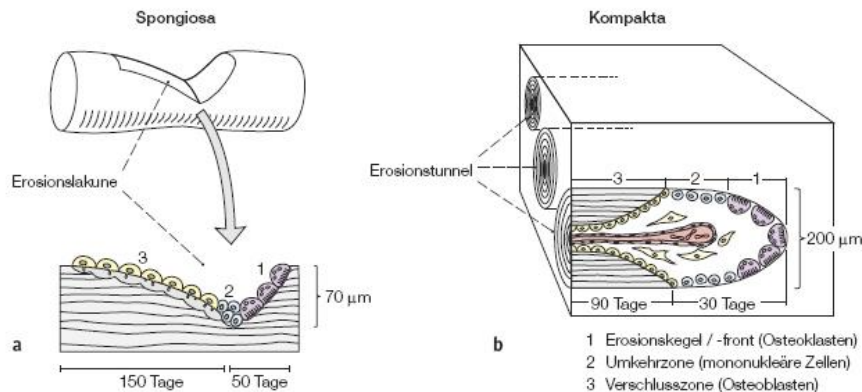
### **2.1.4 Funktioneller Knochenumbau**

Knochengewebe unterliegt kontinuierlich Umbauvorgängen (Remodelling). Die Spongiosa wird jährlich zu 28%, die Kompakta zu 4% umgebaut, sodass das komplette Skelett jährlich zu ca. 10% umgebaut wird. Das Knochenremodelling hat verschiedene Zwecke, wie beispielsweise die Reparatur von Mikroschäden, die Anpassung an veränderte biomechanische Beanspruchung, die Freisetzung von Kalzium und die Vorbeugung von Materialermüdung. Knochenabbau und -aufbau stehen in einem Gleichgewicht. Überwiegt eine dieser beiden Komponenten, kommt es zu einer Erkrankung des Knochens. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)

Der Umbau erfolgt durch „basic multicellular units“ (BMUs), bestehend aus Osteoblasten und Osteoklasten. Es gibt zwei verschiedene Mechanismen des Knochenabbaus bei Spongiosatrabekeln und bei kompaktem Knochen. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Wennemuth & Albrecht 2012)

Beim Abbau der Kompakta liegen an der Spitze der BMUs Osteoklasten, die einen Bohrkanal fressen, an den Seiten Osteoblasten, die Osteoid bilden, und im Zentrum Endothelzellen (Abb. 7b). Hat die erste Osteoblastenkolonne die erste Osteoid-Lamelle produziert, wird sie von der zweiten eingemauert. Ist der Bohrkanal mit 5-20 Lamellen

aufgefüllt und nur noch der Havers-Kanal frei, kehren die Osteoblasten in den Ruhestand zurück und bilden gemeinsam mit Vorläuferzellen das Endost. Die Herstellung eines Osteons dauert Monate und die Mineralisation ist wiederum erst Monate danach abgeschlossen. In der Spongiosa fressen Osteoklasten grubenförmige Erosionslakunen (Howship-Lakunen) (Abb. 7a). Diese werden von Osteoblasten mit neuen Lamellen aufgefüllt, was zu dem unregelmäßigen Lamellenmuster der Trabekel führt. (Lüllmann-Rauch 2006)



**Abbildung 7: Knochenumbau durch BMUs.**

a) Knochenumbau von Spongiosatrabekeln mittels Erosionslakunen. b) Knochenumbau in der Kompakta mit Hilfe von Erosionstunnel. In der (1) osteoklastären Erosionszone findet die Einleitung der Erosion durch Abbau des mineralisierten Knochens durch Osteoklasten statt, woraufhin in der (2) monozytären Umkehrzone der Abbau entkalkter Matrix durch Makrophagen-ähnliche Zellen fortgesetzt wird, bevor in der (3) osteoblastären Verschlusszone die Auflagerung von und somit der Verschluss der Lakunen und Tunnel durch Bildung von Osteoid erfolgt. (Welsch, Deller 2010; Benninghoff, Drenckhahn 2008)

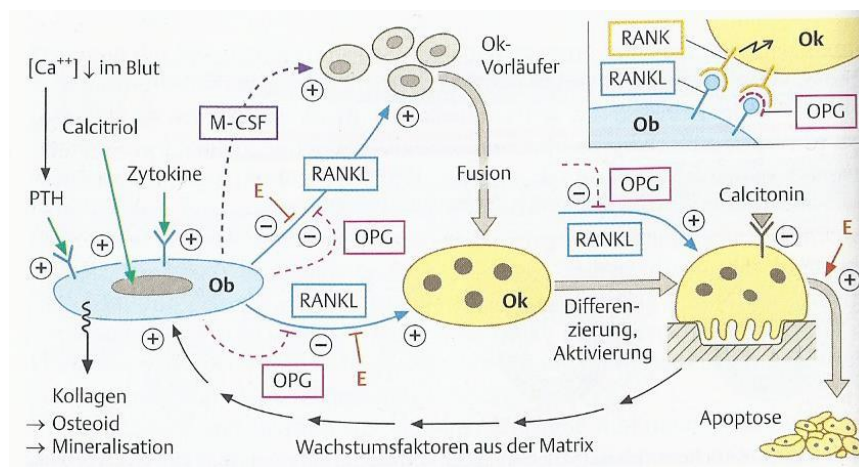
## 2.2 Regulation von Knochenstruktur und Kalziumstoffwechsel

### *Koordination von Osteoblasten und Osteoklasten*

Der Knochenumbau wird insbesondere durch mechanische Beanspruchung reguliert. Wahrscheinlich dienen die Osteozyten als Mechanosensoren, die bei Bedarf Signale an die Osteoblasten abgeben, die wiederum die Osteoklastendifferenzierung sowie -aktivierung induzieren können (Abb. 8). (Lüllmann-Rauch 2006)

Die Koordination der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität erfolgt mit Hilfe verschiedener Zytokine und Hormone. Während des Abbaus der Knochenmatrix durch Osteoklasten werden dort gebundene Wachstumsfaktoren wie beispielsweise IGFs freigesetzt, die die Osteoblastentätigkeit fördern. Die Osteoblasten selbst sezernieren zum Beispiel das Zytokin M-CSF (= Macrophage colony-stimulating Factor), das zur Proliferation der Osteoklastenvorläufer führt. Auf den Osteoklastenvorläufern befindet sich wiederum ein Rezeptor, der RANK (= Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B), an den ein membranständiges Protein der Osteoblasten, der RANK-Ligand (RANKL=

Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), binden kann. Durch die Bindung des RANKL an den RANK wird die Fusion der Osteoklastenvorläufer zu mehrkernigen Zellen und deren Differenzierung induziert. Gleichzeitig erfolgt eine Aktivierung der Osteoklasten und deren Apoptose wird verhindert. Der Osteoblast kann die von ihm induzierten Osteoklasten-aktivierenden Effekte verhindern, indem er Osteoprotegerin (OPG) produziert und sezerniert, welches ebenfalls als Rezeptor für RANKL (auch OPG-Ligand genannt) dient. OPG ist möglicherweise auch in der Lage, die Genexpression von MMP-9 und Carboanhydrase 2 herabzusetzen (Fu et al. 2013). (Lüllmann-Rauch 2006; Welsch & Deller 2010; Wennemuth & Albrecht 2012; Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lacey et al. 1998; Boyle et al. 2003)



**Abbildung 8: Koordination der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität.**

Osteoklasten (Ok) und deren Vorläufer besitzen auf ihrer Oberfläche den Rezeptor RANK, der an ein membranständiges Molekül der Osteoblasten (Ob), den RANKL, binden kann, wodurch es zur Fusion der Ok-Vorläufer sowie zur Differenzierung und Aktivierung der Oks kommt. Der Ob sezerniert einerseits OPG, das als löslicher Rezeptor für RANKL angesehen werden und so die RANK-RANKL-Interaktion verhindern kann, und andererseits M-CSF, der die Proliferation der Ok-Vorläufer fördert. Sinkt der Kalzium-Spiegel des Blutes, wird PTH ausgeschüttet, das an den Ob bindet und inhibierend auf die Osteoidsynthese wirkt sowie die Bildung von M-CSF und RANKL fördert. Calcitriol dahingegen stimuliert die osteoblastäre Proliferation. Calcitonin bindet an Rezeptoren des Ok und hemmt dessen Aktivität. Östrogene (E) stimulieren den Ob und hemmen den Ok. Zytokine und Wachstumsfaktoren aus der Matrix fördern die Proliferation des Ob und die Osteoidsynthese.

Kleines Einschubbild: Interaktion zwischen Ob und Ok: OPG als löslicher RANKL-Rezeptor verhindert die RANK-RANKL-Bindung (Lüllmann-Rauch, 2006)

### ***Beeinflussung des Knochenumbaus durch Hormone und Kalziumstoffwechsel***

Das Knochengewebe enthält über 99% des Gesamt-Kalziums des Körpers und spielt daher als Kalziumreservoir sowie bei der Regulation der Kalziumhomöostase eine wichtige Rolle. Der Kalziumgehalt des Serums beträgt ca. 2,4 mmol/l und wird in engen Grenzen konstant gehalten, da schon geringe Veränderungen zu Gewebeverkalkungen (Hyperkalzinose) oder zu einer Übererregbarkeit von Muskulatur und Nerven (Tetanie) führen können. Es gibt verschiedene Hormone und Mechanismen, die Einfluss auf die Kalziumhomöostase haben. Die den

Knochenumbau beeinflussenden Hormone greifen überwiegend in das RANKL/OPG-Gleichgewicht ein und regulieren so den Knochenumsatz. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)

Sinkt der Kalziumspiegel im Blut, so wird von den Nebenschilddrüsen Parathormon (PTH) ausgeschüttet. Dieses bindet über Rezeptoren an die Osteoblasten. Es wirkt einerseits inhibierend auf die Osteoidsynthese und die Proliferation sowie Differenzierung von Osteoblasten. Andererseits führt PTH zur osteoblastären Bildung von M-CSF sowie RANKL und somit zur Aktivierung und Neubildung von Osteoklasten durch Fusion monozytärer Vorläuferzellen. Dadurch werden Kalzium- und Phosphationen aus dem Knochen freigesetzt und das Serumkalzium erhöht. Des Weiteren wirkt PTH auf die Nierenepithelzellen des distalen Tubulus, die vermehrt Kalziumtransportproteine in ihre Membranen einbauen und so eine verstärkte Kalziumrückresorption ermöglichen. In den proximalen Tubuli erfolgt durch PTH eine Reduktion von Phosphattransportern und somit eine verstärkte Phosphatausscheidung. So kann eine Gewebeverkalkung aufgrund eines erhöhten Kalzium-Phosphat-Produktes, das durch den vermehrten Knochenabbau entsteht, verhindert werden. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006)

Vitamin D<sub>3</sub> wird in der Haut unter Einwirkung von Sonnenlicht gebildet oder über die Nahrung aufgenommen. Niedrige Kalzium- und Phosphatwerte des Blutes und PTH induzieren die Synthese von Calcitriol. Calcitriol bewirkt eine gesteigerte enterale Kalzium- und Phosphationen-Resorption sowie durch Bindung an Osteoblasten eine Stimulation der osteoblastären Proliferation, der Osteocalcinproduktion und in hohen Konzentrationen der Osteoklastendifferenzierung. Calcitriol beeinflusst darüber hinaus sowohl die Proliferation als auch Differenzierung vieler weiterer Zellen, die nichts mit dem Kalziumstoffwechsel zu tun haben (Dospil et al. 2005). (Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Calcitonin wird von den C-Zellen der Schilddrüse produziert und bei erhöhtem Serumkalziumspiegel ausgeschüttet, ist also als Gegenspieler des PTHs anzusehen. Allerdings scheint Calcitonin keine allzu große physiologische Bedeutung mehr zu haben, da eine chronische Erhöhung oder Erniedrigung keine großen Auswirkungen auf den Kalziumhaushalt zu haben scheint (Dospil et al. 2005). Durch Einwirkung auf osteoklastäre Calcitoninrezeptoren hemmt es die Osteoklastenaktivität und somit die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen, was zur Senkung des Serumkalziums führt. Gleichzeitig stimuliert es die Osteoblasten, wodurch es zu vermehrter Knochenmineralisation kommt. In den Nieren fördert Calcitonin die Ausscheidung von Kalzium und Phosphat. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Dospil et al. 2005)

Östrogene steigern die Calcitriol-Synthese und können über Östrogenrezeptoren direkt auf Osteoblasten (Aktivierung) und Osteoklasten (Hemmung) Einfluss nehmen. Des Weiteren inhibieren sie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF und steigern die OPG-Bildung, wodurch die RANKL-Wirkungen gehemmt werden und es zu einem verminderten Knochenabbau kommt. Die Knochen werden durch die Östrogenwirkung also verstärkt mineralisiert, es kommt jedoch auch zum Verschluss der Epiphysenfugen, wodurch das Längenwachstum gebremst wird (Dospil et al. 2005). Androgene haben vergleichbare Effekte auf den Knochen, da Osteoblasten das Enzym Aromatase besitzen und so aus Androgenen Östrogene synthetisieren können. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Lüllmann-Rauch 2006; Freissmuth et al. 2012; Reid 2011; World Health Organization 2003; Bord et al. 2003)

Cortisol ist ein von der Nebennierenrinde produziertes Glukokortikoid, das die Gluconeogenese steigert und somit den Blutzuckerspiegel erhöht. Als sogenanntes Stresshormon sorgt es für eine Anpassung des Organismus an Belastungssituationen und wirkt in höheren Dosen verabreicht immunsuppressiv und antiinflammatorisch (Lüllmann-Rauch 2006). Daher wird es gerne bei entzündlichen und immunologischen Erkrankungen wie beispielsweise Asthma bronchiale, Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn und Multiple Sklerose, Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises sowie zur Immunsuppression therapeutisch eingesetzt wird. Eine Langzeittherapie mit Glukokortikoiden hat einige Nebenwirkungen. So induzieren Glukokortikoide beispielsweise eine vermehrte Proteolyse, wodurch es in den Skelettmuskeln zu Muskelschwäche und in den Knochen durch eine direkte antianabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu einem erhöhten Osteoporoserisiko kommt. Dies geschieht durch Hemmung der Differenzierung von Osteoblastenvorläufern. Durch die Glukokortikoidwirkung kommt es auch zur Lipolyse, d.h. die physiologischen Fettspeicher werden mobilisiert, dann jedoch an anderen Stellen wieder eingelagert. Als Folge entstehen ein Vollmondgesicht, ein Büffelnacken und eine Stammfettsucht. Des Weiteren hemmt Cortisol die enterale Kalziumresorption, die renale Kalziumausscheidung wird gefördert. (Lüllmann-Rauch 2006; Dospil et al. 2005; Bartl et al. 2009; Benninghoff & Drenckhahn 2008; Freissmuth et al. 2012)

## **2.3 Osteoporose**

### **2.3.1 Definition der Osteoporose**

Die Osteoporose wurde international wie folgt definiert: „Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine

Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist mit der Folge vermehrter Knochenbrüchigkeit“ (Consensus Development Conference 1993).

Nach der WHO (World Health Organization) liegt eine Osteoporose vor, wenn „die Knochenmineraldichte um 2,5 Standardabweichungen unterhalb des statistischen Mittelwerts gesunder prämenopausaler Frauen liegt“ (Wülker 2010; Bartl & Bartl 2011). Die Osteoporose ist eine weit verbreitete systemische Skeletterkrankung, die häufigste im höheren Lebensalter. Sie hat weitreichende Folgen, da sie zu Knochenbrüchigkeit und somit zu vermehrten Frakturen führt. Dies hat wiederum bei den betroffenen Patienten starke Einschränkungen der Mobilität und Selbstständigkeit und somit eine reduzierte Lebensqualität zur Folge. (Reid 2011; Herold 2012)

Die WHO nahm bereits 1994 an, dass etwa ein Drittel aller postmenopausalen Frauen von einer Osteoporose betroffen ist (Bartl & Gradinger 2009). In Deutschland gibt es schätzungsweise 5-8 Mio. Menschen, die an einer Osteoporose erkrankt sind. Die Erkrankung wird häufig erst durch eine Fraktur auffällig, wobei auch nur ein Drittel der Osteoporose-assoziierten Frakturen überhaupt medizinisch versorgt werden. Werden die Knochenbrüche nicht erkannt, kommt es zu chronischen Schmerzen, körperlichen Einschränkungen und Deformation. (Reid 2011; Bartl & Gradinger 2009; Bartl & Bartl 2011)

85% aller Osteoporose-assoziierten Frakturen sind bei postmenopausalen Frauen anzutreffen. Ungefähr jede dritte Frau über 50 Jahre erleidet im Laufe ihres Lebens eine solche (Bartl & Gradinger 2009). Obwohl generalisiert Frakturen auftreten können, sind der Wirbelkörper, der Oberschenkelhals und der distale Radius anfälliger für Low-trauma-Frakturen, wie sie häufig bei Osteoporose zu finden sind. Daher seien gemäß Bartl & Bartl 2011 insgesamt 90% aller Oberschenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen und 70% aller distalen Radiusfrakturen auf Osteoporose zurückzuführen. (Reid 2011; Sambrook & Cooper 2006; Bartl & Gradinger 2009; Bartl & Bartl 2011)

Generell liegt das 10-Jahres-Risiko für eine Schenkelhalsfraktur ab 75 Jahren über 20% (Herold 2012). Eine Schenkelhalsfraktur wiederum hat je nach Literatur eine 1-Jahres-Mortalitätsrate von 10-30% (Reid 2011; Herold 2012). Noch 2009 wurde vermutet, dass in Deutschland lediglich 10-15% der Patienten mit manifester Osteoporose leitliniengerecht behandelt werden, was zeigt, dass die Osteoporose leider noch eine unterdiagnostizierte und untertherapierte Erkrankung ist (Bartl & Gradinger 2009).

Gesundheitsökonomisch betrachtet verursachen die Folgen der Osteoporose allein in Deutschland jährlich Kosten in Milliardenhöhe, die mit zunehmender Lebenserwartung der Menschen weiter steigen werden, wenn nicht daran gearbeitet wird, Osteoporose frühzeitig zu verhindern bzw. zu erkennen und suffizient zu therapieren. (Herold 2012;

Braun & Pfeilschifter 2010; Bartl & Gradinger 2009; Müller 2011; Häussler et al. 2006; Bartl et al. 2003; Bartl & Bartl 2011)

### 2.3.2 Stadieneinteilungen

#### ***Primäre vs. sekundäre Osteoporose***

In 95% der Fälle liegt eine primäre, nur in 5% der Fälle eine sekundäre Osteoporose vor, wobei 80% aller Osteoporosen postmenopausale Frauen betreffen. Bei den sekundären Osteoporosen spielen eine Immobilisation und eine Glukokortikosteroid-Therapie die größte Rolle. (Herold 2012)

#### Primäre Osteoporose (95 %) (Herold 2012):

- Idiopathische Osteoporose junger Menschen
- Postmenopausale Osteoporose (= Typ I-Osteoporose)
- Senile Osteoporose (= Typ II-Osteoporose)

#### Sekundäre Osteoporose (5 %) (Herold 2012; Reid 2011):

- Iatrogen bzw. medikamentös bedingt: Langzeittherapie mit Kortikosteroiden, Glitazonen, Protonenpumpenhemmern, Aromatasehemmern, Antiandrogenen, Antiepileptika, etc.
- Immobilisation
- Endokrine Ursachen: Hyperkortisolismus, Hypogonadismus, Hyperthyreose, primärer Hyperparathyreoidismus, etc.
- Malabsorptionssyndrom, Gastrektomie

#### ***Postmenopausale vs. senile Osteoporose***

Die postmenopausale Typ I-Osteoporose und die senile Typ II-Osteoporose unterscheiden sich in vielen Punkten.

Die postmenopausale Osteoporose ist besonders bei Frauen zwischen 50 und 70 anzutreffen und durch den Östrogenmangel in der Postmenopause bedingt. Der Knochenverlust ist eher trabekulär als kortikal gelegen und es finden sich vor allem Frakturen der Wirbelkörper. Bei der frühen postmenopausalen Osteoporose (die ersten 10 Jahre nach der Menopause) kann man bei gesteigertem Umbau („high turnover“) einen Knochenmassenverlust beobachten, der mehr als 3% der trabekulären Knochendichte jährlich beträgt. Bei der späten postmenopausalen Osteoporose ist der Knochenumbau reduziert („low turnover“), sodass der trabekuläre Knochendichteverlust jährlich weniger als 3% ausmacht. (Herold 2012)

Die senile Osteoporose findet man bei Patienten beider Geschlechter (weiblich: männlich = 2:1) ab dem 70. Lebensjahr. Sie ist multifaktoriell bedingt, insbesondere durch den physiologischen Alterungsprozess, Bewegungsmangel sowie durch Mangelernährung (v.a. Kalzium und Vitamin D), und verursacht einen gleichermaßen trabekulären und kortikalen Knochenverlust. Die Patienten werden meist klinisch auffällig durch Frakturen des Schenkelhalses, des Humerus, des Radius oder der Wirbelkörper. (Herold 2012)

### **2.3.3 Risikofaktoren für die Entstehung einer Osteoporose**

Die Knochenmasse baut sich im Kindes- und Jugendalter auf, bevor sie ungefähr im Alter zwischen 20 und 30 Jahren ihren Höchstwert („peak bone mass“) erreicht. Dieser Höchstwert liegt bei Männern generell etwa 30% höher als bei Frauen. Physiologisch kommt es ab dem 40. Lebensjahr zu einer kontinuierlichen Abnahme der Knochenmasse um 0,5% pro Jahr, wobei dieser Verlust in den ersten 10 Jahren der Postmenopause höher liegt (mindestens 2% pro Jahr). Der altersabhängige Knochenmassenverlust wird vor allem durch eine erhöhte Osteoklastenaktivität bei vergleichsweise verminderter Osteoblastenaktivität verursacht (Reid 2011). Es gibt verschiedenste, teilweise auch beeinflussbare Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose und Osteoporose-assoziiierter Frakturen. (Herold 2012; Reid 2011)

***Die Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären Osteoporose (Reid 2011; Herold 2012; Bartl & Gradinger 2009; Dachverband Osteologie e.V.; Netter & Böttcher 2001) sind:***

#### Nicht-beeinflussbare Risikofaktoren:

- Alter: Durch Abnahme der Knochenmasse
- Geschlecht: Frauen (50% geringeres Frakturrisiko bei Männern)
- Genetische Faktoren: Positive Familienanamnese, Kaukasier, Asiaten
- vorausgegangene Low-trauma-Fraktur
- bekannte Oberschenkelhalsfraktur in der Familie

#### Beeinflussbare Risikofaktoren:

- Mangel an Geschlechtshormonen bzw. verkürzte Östrogenexpositionszeit (< 30 Jahre) durch späte Menarche, frühe Menopause
- Immobilisation, körperliche Inaktivität
- Mangelernährung: Mangel an Kalzium und Vitamin D

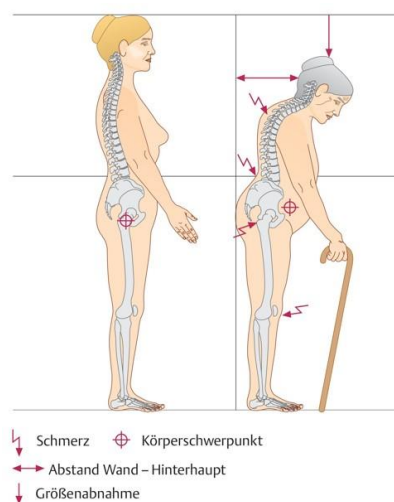


- Untergewicht/ Kachexie ( $\text{BMI} < 20 \text{ kg/m}^2$ )
- Nikotinabusus (Östrogenantagonismus), Alkoholismus
- Multiple Stürze
- Sturzbegünstigende Medikamente (z.B. Sedativa, Neuroleptika, Antidepressiva)
- Hyperthyreose: Da Osteoklasten empfindlicher auf Schilddrüsenhormone reagieren, kommt es zu einem gesteigerten Knochenumbau bei Überwiegen des Knochenabbaus.
- Hyperparathyreoidismus: gesteigerter Knochenumsatz, insgesamt negative Skelettbilanz

Des Weiteren gibt es auch einige mit Osteoporose assoziierte Erkrankungen wie beispielsweise die Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Typ-1-Diabetes, Epilepsie sowie hereditäre Erkrankungen wie Osteogenesis imperfecta, Ehlers-Danlos-Syndrom, Marfan-Syndrom und Homozysteinurie. (Herold 2012; Netter & Böttcher 2001; Braun & Pfeilschifter 2010; Bartl & Gradinger 2009; Reid 2011; Dachverband Osteologie e.V.)

### 2.3.4 Diagnose und Therapie der Osteoporose

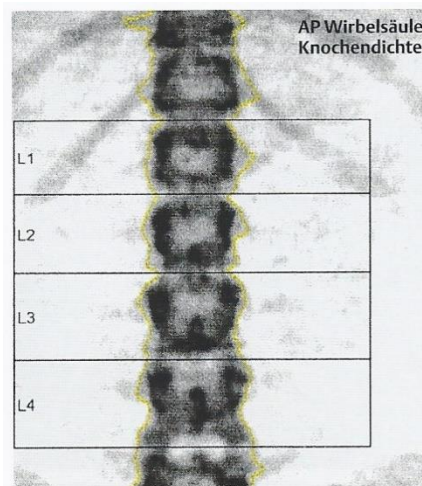
Klinisch fallen Patienten mit Osteoporose durch Knochenschmerzen sowie durch Spontanfrakturen bzw. Frakturen ohne adäquates Trauma auf. Im Laufe der Erkrankung kann es zur Deformierung der Wirbelkörper, genauer zu Keilwirbelbildungen, zur Kyphosierung der Brustwirbelsäule und so zur Rundrücken- und Gibbusbildung kommen (Abb. 9). Diese Veränderungen führen zur Abnahme der Körpergröße, sodass am Rücken tannenbaumartig angeordnete Hautfalten (Tannenbaumphänomen) beobachtet werden können. (Herold 2012; Reid 2011)



**Abbildung 9: Wirbelsäulenveränderungen durch Osteoporose.**

Durch die fortschreitende Osteoporose kommt es zur Keilwirbelbildung, zur Kyphosierung der Wirbelsäule und somit zu vermehrten Schmerzen und zur Abnahme der Körpergröße (Bartl & Bartl 2011).

Es wird empfohlen, bei jeder Frau ab dem 70. und bei jedem Mann ab dem 80. Lebensjahr bzw. bei bekannten Risikofaktoren schon früher eine Osteoporose-diagnostik durchzuführen (Braun & Pfeilschifter 2010). Zur Diagnostik gehören eine gründliche Anamnese, in der die Risikofaktoren erfragt werden, sowie eine ausführliche körperliche Untersuchung, die Hinweise auf eine sekundäre Osteoporose liefern kann. Methode der Wahl um eine Osteoporose sicher zu diagnostizieren, ist die Knochendichtemessung (Osteodensitometrie), meistens in Form der DXA (Dual X-ray-Absorptiometrie, Abb. 10). Bei dieser Methode wird die Flächendichte des Knochenmineralgehaltes ( $\text{g/cm}^2$ ) an der Lendenwirbelsäule (LWS), am proximalen Gesamtfemur und am Schenkelhals gemessen. Zur Beurteilung der Ergebnisse wird der sogenannte T-Wert (=T-Score) herangezogen. Dieser bezeichnet die Standardabweichung (SD=standard deviation) vom Mittelwert der maximalen Knochendichte („peak bone mass“) gesunder, 30-jähriger Menschen. Eine Osteoporose liegt vor, wenn der T-Wert um 2.5 Standardabweichungen unterhalb des Mittelwerts liegt. Alternativ könnte man die Ultraschalldensitometrie am Kalkaneus oder den Fingern bzw. die quantitative Computertomographie (QCT) an der oberen LWS und am Unterarm anwenden. Die Ultraschalldensitometrie hat eine ähnlich gute Vorhersagekraft bzgl. osteoporotischer Frakturen wie die DXA, die QCT erlaubt sogar genauere Aussagen angesichts wissenschaftlicher Fragestellungen, ist jedoch im Hinblick auf die Frakturvorhersage weniger untersucht. (Braun & Pfeilschifter 2010; Herold 2012)



**Abbildung 10: DXA-Messung der Lendenwirbelsäule (L1-4) (Bartl & Bartl 2011).**

Zur Diagnose einer Fraktur eignen sich das konventionelle Röntgen und die Computertomographie. Laborchemisch kann man viele den Knochenmetabolismus beeinflussende Marker analysieren, um so zwischen einer primären (keine Veränderung bis auf eine evtl. Erhöhung der alkalischen Phosphatase) und einer

sekundären Osteoporose (verschiedenste laborchemische Veränderungen abhängig von Grunderkrankungen und der Ursache) differenzieren zu können. (Braun & Pfeilschifter 2010; Herold 2012)

Therapeutisch stehen die Festigung des Knochens, die Vermeidung von Stürzen sowie Schmerztherapie im Vordergrund. Eine ausreichende Zufuhr an Kalzium und Vitamin D ist hierbei sehr wichtig. Mit einer ausgewogenen Ernährung (Milchprodukte, Mineralwasser) kann meistens eine ausreichende Kalziumaufnahme gewährleistet werden. Ein Vitamin D-Mangel ist häufiger. Er bewirkt einen Kalziummangel und verschlechtert auch die muskuläre Balance, sodass auf eine ausreichende Sonnenbestrahlung täglich geachtet und ggf. Vitamin D substituiert werden sollte (800-2000 IE Vitamin D täglich). Des Weiteren sollte mit dem Rauchen aufgehört und regelmäßig das TSH kontrolliert werden, um eine Überdosierung mit L-Thyroxin zu vermeiden, die mit einer erhöhten Frakturanfälligkeit einhergeht. Orale Glukokortikoide sollten so wenig und niedrig wie möglich eingesetzt und Untergewicht vermieden werden. Zur Verhinderung von Stürzen, sollten Muskelkraft und Koordination trainiert und Visus, Schuhwerk und Hilfsmittel optimiert werden. (Braun & Pfeilschifter 2010; Herold 2012; Müller 2011; Holick & Chen 2008)

<b>Antiresorptiva</b>	<b>Osteoanabolika</b>
Bisphosphonate	Parathormon
Selektive Östrogen-Rezeptor-Antagonisten (Raloxifen)	Teriparatid (rekombinantes Parathormon-Fragment)
Calcitonin	Fluoride
Strontium Ranelat	Strontium-Ranelat
Kalzium	Anabolika (z.B. Testosteron)
Vitamin D/Vitamin D-Metabolite	
Statine	
Östrogene, Östrogen/Gestagen	
Tibolon (gewebsselektiver Regulator der Östrogenaktivität (=STEAR: selective tissue estrogenic activity regulator))	
Denosumab (Antikörper gegen RANKL)	
Cathepsin K-Inhibitoren	
Osteoprotegerin	
Integrin-Inhibitoren	

**Tabelle 1: Medikamentöse Osteoporose-Therapie (Bartl & Bartl 2011; Braun & Pfeilschifter 2010; Reid 2011)**

Nach der Leitlinie der DVO (Dachverband Osteologie) von 2009 wird als Schwelle zum Beginn einer medikamentösen Langzeittherapie bei gesicherter Osteoporose ein 10-Jahres-Frakturrisiko von 30% angesehen, da sich dann die Frakturrate evidenzbasiert senken lässt (Dachverband Osteologie e.V.; Herold 2012). Dieses Risiko wird anhand

der Knochendichte, dem Lebensalter, dem Geschlecht sowie anhand weiterer Risikofaktoren ermittelt. Es werden entweder Substanzen eingesetzt, die die Knochenfestigkeit überwiegend durch Hemmung des Knochenumbaus verbessern (Antiresorptiva), oder osteoanabole Substanzen, die den Knochenumbau und insbesondere die Osteoblasten stimulieren (Tabelle 1=Tab. 1). (Braun & Pfeilschifter 2010; Herold 2012; Bartl & Bartl 2011; Müller 2011)

### **2.3.5 Osteoporose durch Östrogenmangel (Postmenopause), Multidefizienzdiät und Steroide**

Die postmenopausale Typ-I Osteoporose ist vor allem durch Östrogenmangel bedingt. Der durch einen Hypogonadismus (=Keimdrüsenunterfunktion) entstehende Mangel an Sexualhormonen kann sowohl bei Männern als auch bei Frauen zu Osteoporose führen, jedoch sind in 80% aller Fälle postmenopausale Frauen betroffen (Netter & Böttcher 2001; Herold 2012). Der Östrogenmangel verursacht eine verminderte Knochenmasse, einerseits durch die vermehrte Bildung von resorptiven Faktoren und damit einhergehend von Osteoblasten und -klasten mit verlängerter Überlebenszeit der Osteoklasten. Andererseits verringert sich die Knochenmasse auch durch die fehlende Östrogenwirkung auf den Gastrointestinaltrakt und die Nieren. Es kommt zu einem erhöhten Knochenumsatz mit einem Ungleichgewicht zwischen Knochenabbau und -aufbau, das insgesamt zu Knochenverlust und qualitativ minderwertigem Knochen führt. (Reid 2011; Herold 2012; Netter & Böttcher 2001)

Eine Mangelernährung (Malnutrition, Malabsorption) kann zu einer Minderversorgung mit Eiweiß, Vitamin D und Kalzium führen, was wiederum einen Knochenschwund verursachen kann. Dies geschieht unter anderem durch Stimulation der PTH-Ausschüttung, wodurch der Knochenumsatz (bei gleichzeitigem Überwiegen des Knochenabbaus) gesteigert wird und eine Bereitstellung von Kalzium und Phosphat aus dem Knochen erfolgt. Durch das geringe Serumkalzium und PTH wird die Calcitriol-Produktion stimuliert. (Bartl & Gradinger 2009; Bartl & Bartl 2011; Reid 2011; Lüllmann-Rauch 2006; Benninghoff & Drenckhahn 2008)

Insbesondere bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen sowie älteren, hospitalisierten Personen herrscht häufig ein schwerer Protein-, Kalzium- und Vitamin-D-Mangel, sodass diese besonders von einer Vitamin D- und Kalzium-Substitution profitieren. Vitamin D-Mangel führt nicht nur zu einer schlechteren Kalziumresorption, sondern auch zu einer verschlechterten muskulären Balance und bildet somit einen sehr wichtigen, beeinflussbaren Risikofaktor für Stürze und somit auch für Frakturen. (Netter & Böttcher 2001; Braun & Pfeilschifter 2010; Bartl & Gradinger 2009; Weinstein et al. 2002; Reid 2011)

Eine Therapie mit Glukokortikosteroiden spielt eine sehr große Rolle als Ursache für eine sekundäre Osteoporose, wobei natürlich auch eine endogene Erhöhung des Cortisolspiegels zu einem Verlust an Knochenmasse führen kann. Glukokortikosteroide führen einerseits zu einer verminderten intestinalen Kalziumresorption und haben andererseits auch eine direkte antianabole Wirkung auf den Knochenstoffwechsel. Die entstehende Osteopenie betrifft überwiegend das Achsenskelett, weniger die Extremitäten. (Netter & Böttcher 2001; Bartl & Bartl 2011)

### **2.3.6 Osteomalazie – eine wichtige Differenzialdiagnose zur Osteoporose**

Eine der wichtigsten Differenzialdiagnosen zur Osteoporose ist die Osteomalazie, die ebenfalls zu vermehrter Knochenbrüchigkeit und erniedrigten Messwerten in der DXA führt (Braun & Pfeilschifter 2010). Während bei der Osteoporose sowohl im organischen als auch im mineralischen Anteil des Knochens eine Verminderung der Knochenmasse und der Knochenarchitektur nachgewiesen werden kann, die Verkalkung der Knochenmatrix an sich jedoch normal ist, ist bei der Osteomalazie die Mineralisation der Knochenmatrix gestört. Histologisch erkennt man ausgedehnte Bereiche unverkalkten Osteoids, es erfolgt eine reduzierte Einlagerung von Kalzium und Phosphor. Vor Abschluss des Knochenwachstums wird die Erkrankung Rachitis genannt und führt zur Retardierung von Knochenwachstum und Skelettreifung, nach abgeschlossenem Knochenwachstum spricht man von Osteomalazie. (Braun & Pfeilschifter 2010; Herold 2012; Netter & Böttcher 2001)

Die häufigste Ursache für eine Osteomalazie ist Vitamin D-Mangel, wobei es auch deutlich seltenere Vitamin D-unabhängige Formen gibt. Der Vitamin D-Mangel kann entweder durch Malassimilation, zu geringe Vitamin D-Zufuhr oder mangelnde UV-Bestrahlung entstehen, was insgesamt bei älteren Menschen häufig der Fall ist. Alternativ kann es natürlich auch Störungen im Vitamin D-Stoffwechsel geben, beispielsweise im Rahmen hereditärer Erkrankungen oder einer Leber- bzw. Niereninsuffizienz. Klinisch fallen die betroffenen Patienten meist durch Skelettschmerzen, Knochenverbiegungen und Gehstörungen sowie durch eine Neigung zu Tetanie auf. Laborchemisch zeigt sich bei einer Vitamin D-abhängigen Osteomalazie eine Erhöhung der alkalischen Phosphatase und des PTHs, ein niedrig normales bis erniedrigtes Serumkalzium sowie teilweise eine Verminderung von Calcitriol bzw. einer der Vorstufen und eine Hypo- oder Hyperphosphatämie, je nach Ursache des Vitamin D-Mangels. Diagnostisch ähnelt das Vorgehen dem bei der Osteoporose. Therapeutisch wird neben einer Vitamin D-Substitution auch die Grunderkrankung behandelt und der Serumkalziumspiegel streng überwacht. (Netter & Böttcher 2001; Herold 2012; Braun & Pfeilschifter 2010)

## 2.4 Fragestellung und Zielsetzung

Ziel dieser tierexperimentellen Studie an der Ratte war es, einen mit dem Menschen vergleichbaren osteoporotischen Knochenstatus im Kleintiermodell zu induzieren, und so standardisierte, reproduzierbare Grundlagenmodelle zu schaffen. Durch die Kombination operativer, hormoneller, diätetischer und medikamentöser Maßnahmen sollte eine klinisch relevante Knochenbrüchigkeit erzielt werden.

Die Behandlung mit Ovariectomie und Multidefizienzdiät (OVX+D) sollte nach einer relativ kurzen Standzeit (1 und 3 Monate) eine postmenopausale Osteoporose (high-turnover), nach einer längeren Standzeit (12 und 14 Monate) eine senile Osteoporose (low-turnover) induzieren. Die Ratten, die nach der Ovariectomie Steroidapplikationen (OVX+S) erhielten, sollten eine steroidinduzierte Osteoporose entwickeln.

Um dies anhand enzym- und immunhistochemischer Färbungen zeigen zu können, mussten zunächst Methoden zur histomorphometrischen Auswertung entwickelt werden, die kostengünstig und reproduzierbar sind und semi-automatisiert durchgeführt werden können.

Es ergeben sich folgende Hypothesen, deren Bestätigung oder Widerlegung Ziele dieser Arbeit sind:

- Bereits rein morphologisch wird durch die Osteoporoseinduktion eine Ausdünnung des Trabekelwerks und somit eine reduzierte Knochenmasse zu erkennen sein.
- Durch die Behandlung überwiegt der durch Osteoklasten -vermittelte Knochenabbau im Vergleich zum osteoblastären Knochenaufbau, was insgesamt zu einer Verringerung der Knochendichte führt.
- Es lässt sich durch die Behandlung im Vergleich zur Sham-Gruppe ein unausgewogener Knochenmetabolismus mit einem Ungleichgewicht osteoanaboler und -kataboler Enzyme mit Überwiegen des Osteokatabolismus erkennen.

Die experimentellen Untersuchungen bahnen einer methodischen Weiterentwicklung in der Forschung und Diagnostik im osteoporotischen Knochen den Weg. Die neu entwickelten, semi-automatisierten Auswertungsmethoden histologischer Färbungen erlauben nachfolgenden Forschern die zellulären und extrazellulären Veränderungen im osteoporotischen Knochen mittels eines standardisierten Protokolls auszuwerten und so subjektive Fehler zu minimieren.

Darüber hinaus bietet diese Arbeit die Möglichkeit, den Effekt der Osteoporose abhängig von der Behandlung innerhalb der Extrazellulärmatrix (EZM) zu untersuchen.

Die hierbei neu gewonnenen Erkenntnisse können genutzt werden, um Pharmazeutika zu entwickeln, die entweder systemisch zur Prävention oder lokal zur Unterstützung der Knochenheilung genutzt werden können.

## **3. Material und Methoden**

### **3.1. Versuchstiere**

Als Versuchstiere dienten 98 weibliche, 10 Wochen alte Sprague Dawley Ratten (Charles River Laboratories, Research Models and Services Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Nach 4 Wochen Standzeit im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig-Universität in Gießen (Frankfurterstraße 105, 35392 Gießen, Deutschland) wurden die Ratten operiert bzw. eine Kontrollgruppe euthanasiert. Dieser Zeitpunkt diente als Ausgangszeitpunkt (Standzeit= time point=TP=0 Monate=0M) der Versuchsreihe. Alle folgenden Angaben zu Standzeiten der Versuchstiere beziehen sich auf diesen Zeitpunkt.

### **3.2 Tierhaltung und –fütterung**

Die Tiere wurden während der gesamten Versuchsreihe artgerecht im Zentralen Tierlaboratorium der Justus-Liebig-Universität in Gießen gehalten. Sie lebten dort in einem für Labortiere ausgestatteten Makrolonkäfig Typ III und IV mit Einstreu. Die Tiere wurden von Pflegern und Tierärzten mit langjähriger Berufserfahrung betreut und nicht nur die Tierhaltung, sondern auch die Operationen, die postoperative Nachsorge sowie die Euthanasien unterlagen strengen veterinärmedizinischen Kontrollen.

Die Wasseraufnahme erfolgte ad libitum und die Fütterung abhängig von der Nahrung der jeweiligen Versuchsgruppe. Die Beleuchtung der Räume wurde entsprechend eines Tag/Nacht-Rhythmus geregelt.

### **3.3 Versuchsanordnung**

Das Versuchsvorhaben des Projektes T1 des SFB/Transregio 79 wurde nach § 8b Absatz 3 Nr. 3 durch das Regierungspräsidium Gießen, Veterinärdezernat (Schanzenfeldstraße 8, 35578 Wetzlar, Deutschland) genehmigt (89/2009). Der Antrag erfolgte nach § 8 Absatz 2 des Tierschutzgesetzes.

Nach Randomisierung wurden die 98 weiblichen Sprague Dawley Ratten auf 13 Gruppen aufgeteilt, die sich sowohl in der Standzeit als auch in der Behandlung unterschieden. Nach einer Standzeit von 4 Wochen im Zentralen Tierlaboratorium in

Gießen wurde mit der Behandlung begonnen. Dieser Zeitpunkt gilt für die gesamte Versuchsreihe als Ausgangszeitpunkt (TP=0M, Abb. 11). Es erfolgte die Euthanasie einer Kontrollgruppe (n=10, TP=0M), um so eine Messbasis bzw. Ausgangswerte von jungen, gesunden Tieren zu erhalten. Die restlichen Tiere wurden zeitgleich teilweise einer Ovariectomie (OVX), teilweise einer Sham-Operation (=Scheinoperation) unterzogen.

Nach Durchführung der Operationen und einer zweiwöchigen Erholung erhielten die ovariectomierten Tiere entsprechend der Gruppenzugehörigkeit entweder eine (Multidefizienz-)Diät oder eine Standarddiät (Normalfutter) plus Steroide (Dexamethason, Pilotgruppe: Methylprednisolon). Die shamoperierten Ratten erhielten eine Standarddiät. Die Euthanasien der operierten Tiere erfolgten abhängig von der Gruppenzugehörigkeit zum Zeitpunkt 1M, 3M, 12M und 14M (Abb. 11).

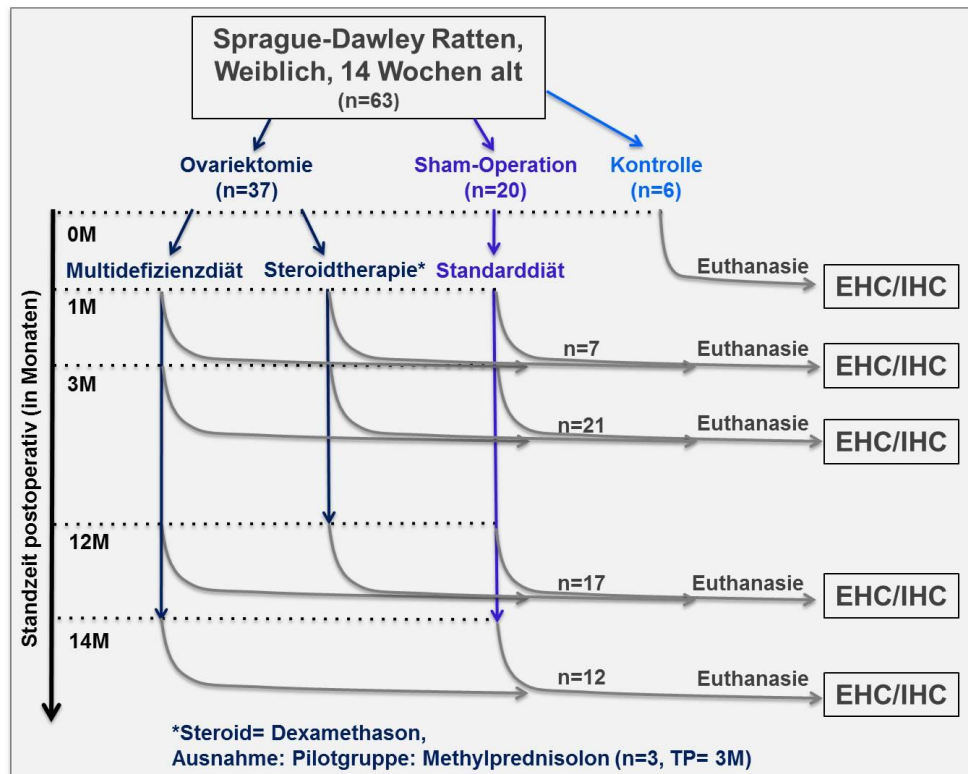
Nach einer Standzeit von 1M wurden drei Gruppen euthanasiert (ursprünglich jeweils n=3, bei zwei Gruppen verstarb jedoch eine Ratte): zur Untersuchung einer postmenopausalen Osteoporose Tiere der Gruppe OVX+Diät (OVX+D), zur Analyse einer steroidinduzierten Osteoporose Tiere der Gruppe OVX+Steroid (OVX+S) und Tiere der Sham-Gruppe (Sham) als Kontrolle. Das Gleiche wurde nach einer Standzeit von 3M wiederholt, diesmal jedoch mit einer höheren Anzahl von Tieren pro Gruppe (jeweils n=10). Der Versuch wurde nachträglich mit einer Pilotgruppe (OVX+Methylprednisolon=OVX+MP, n=3, TP=3M) wiederholt, da aufgrund der Ergebnisse der Gruppe OVX+S (Steroid= Dexamethason) ausgetestet werden sollte, ob ein anderes Steroid noch deutlichere Effekte hervorruft.

Zur Induktion einer senilen Osteoporose wurde ein Teil der ovariectomierten Ratten 12M bzw. 14M mit einer Multidefizienzdiät ernährt und anschließend euthanasiert, je n=10 pro Zeitpunkt. Zeitgleich wurden jeweils n=10 Sham-Tiere getötet. Um auch die Auswirkungen einer Langzeit-Steroidtherapie untersuchen zu können, sollten ursprünglich je 3 Tiere pro Gruppe 12M bzw. 14M lang nach der Ovariectomie mit Steroiden behandelt werden. Da der Allgemeinzustand der Tiere jedoch bereits nach 12M reduziert und schon ein Tier verstorben war, wurden die verbleibenden Tiere zeitgleich euthanasiert (TP=12M), um für diesen Zeitpunkt verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Nach der Euthanasie der Tiere wurden die Knochen (Wirbelkörper L3) präpariert und weiterverarbeitet (siehe Kapitel 3.7), um dann mit Hilfe der Enzymhistochemie (EHC) und der Immunhistochemie (IHC) die Unterschiede im Knochenmetabolismus der verschiedenen Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu analysieren. Hierzu wurden Paraffinschnitte von maximal 6 Tieren pro Gruppe angefertigt, daher wurden für die



enzym- und immunhistochemischen Testungen insgesamt die Knochen von 63 der 98 Ratten analysiert (Abb. 11).



**Abbildung 11: Studiendesign für die enzym- und immunhistochemischen Testungen im osteoporotischen Knochen und bei den Sham-Ratten.**

Es wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten benutzt, die im Folgenden genannten Zahlen beziehen sich auf die letztlich für die EHC und IHC genutzten Tiere. Die Kontrollgruppe wurde sofort euthanasiert, um einen initialen Knochenstatus zu erhalten. 37 Ratten wurden ovariectomiert (OVX), 20 Sham-operiert (Sham). Daraufhin erhielt ein Teil der ovariectomierten Tiere eine Multidefizienz-Diät (D), der andere Teil Steroidapplikationen (S). Die Sham-Tiere bekamen eine Standarddiät. Nach einer Standzeit von einem Monat (1M), 3M, 12M und 14M wurden die Ratten je nach Gruppe euthanasiert. Die gewonnen Paraffinschnitte des Wirbelkörpers L3 wurden für enzym- und immunhistochemische (EHC, IHC) Analysen genutzt.

### 3.4 Operationsablauf

#### 3.4.1. Narkose

Alle Versuchstiere, bis auf die Kontroll-Gruppe (TP=0M), wurden in Narkose versetzt und entweder einer Ovariectomie oder einer Sham-Operation unterzogen. Zur Narkose wurde eine Mischspritze mit 7,5 mg/kg KG Xylazin (Rompun® 2%, Fa. Bayer Health Care AG, Leverkusen, Deutschland) und 62,5 mg/kg KG Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden, Deutschland) gelöst in körperwarmer 0,9% NaCl-Lösung verwendet. Die Substanzen wurden mit einer G26 Kanüle in die Schwanzvenen der Tiere injiziert.

### 3.4.2 Operation

Die Ratten wurden jeweils ventral auf eine Heizmatte mit einer Temperatur von maximal 38°C gelegt und die Haut im Rücken-Lendenwirbelbereich rasiert (Rasierer für Labornager, Fa. Indulab AG, Gams, Schweiz). Das Operationsgebiet wurde mit einem nichtalkoholischen Desinfektionsmittel (Braunol®, Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und anschließend steril abgedeckt. Der operative Zugang erfolgte über einen 1,5 cm langen Hautschnitt über der Wirbelsäule, der unterhalb des Rippenbogens mit einem Skalpell gesetzt und nach kaudal verlängert wurde. Anschließend erfolgte die stumpfe Freipräparation des Bindegewebes zwischen Haut und Muskulatur. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Bauchwand angehoben und scharf eröffnet. Unter Pinzettenschutz erfolgte eine Verlängerung des Schnittes, um eine ausreichende Öffnung zur Bauchhöhle zu erhalten. Nun wurden Uterus, Ovar und das umliegende Fettgewebe nach außen mobilisiert und das Ovar freipräpariert. Anschließend wurde der Eileiter unterhalb des Ovars doppelt ligiert und das Ovar abgetrennt (Abb. 12).



**Abbildung 12: Ovarektomie.**

A) Mobilisieren des Ovars, Uterushorn vor Ligatur, B) Uterushorn nach Ligatur, Abtrennen des Ovars, C) Darstellung der Ovarien nach Ovarektomie.

Der Verschluss der Bauchhöhle erfolgte mit einem resorbierbaren 5-0 (Vicryl UPS = 1,0 metric) Faden mit 2-3 Einzelknoten. Der beschriebene Eingriff wurde anschließend auf der Gegenseite wiederholt. Die Hautwunde wurde abschließend mit 3-4 Wundverschlussklammern verschlossen und desinfiziert.

Die Sham-Operationen (=Scheinoperationen) wurden durchgeführt, um die Kontrolltiere ebenfalls den Begleitfaktoren einer Operation (Narkosestress, peri- und postoperative Schmerzen) auszusetzen, und so eine bessere Vergleichbarkeit zu erreichen. Hierbei wurden die Ovarien der Kontrolltiere lediglich mobilisiert und anschließend wieder in die Bauchhöhle verlagert.

### 3.4.3 Postoperative Überwachung

Bis zum Wiedererlangen des Bewusstseins wurden die Tiere in einer warmen, leicht kontrollierbaren Umgebung unter regelmäßiger Überprüfung der Vitalparameter gehalten. Peri- sowie bis fünf Tage postoperativ erfolgte eine Schmerzmedikation mit Meloxicam (Metacam®, Fa. Boehringer Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland) in einer Dosierung von 0,2 mg/kg KG/d s.c. Nach der Operation waren die Tiere für mindestens fünf Tage in Einzelhaltung, da eine gegenseitige Verletzung unter Schmerzmedikation ausgeschlossen werden sollte. Tierärzte und Pfleger kontrollierten täglich das Allgemeinbefinden der Tiere sowie die Heilung der Operationswunde.

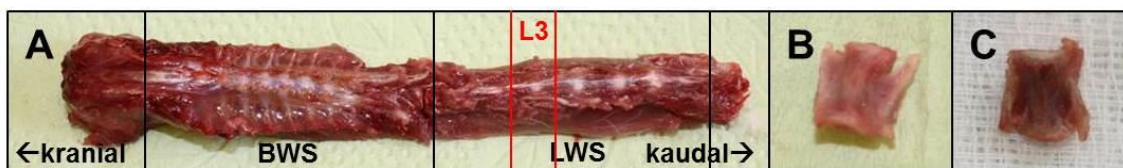
### 3.5 Diät und Glukokortikoidgabe

Die Tiere der Diät-Gruppen (jeweils OVX+D, TP=1M, 3M, 12M, 14M) erhielten eine Multidefizienzdiät (Altromin-C1034 und C100, Fa. Altromin-Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland). Diese zeigte keinerlei kalorische Unterschiede, aber im Vergleich zur Standarddiät 0% Vitamin D2/D3, 15% Calcium, 7% Phosphor, 50% Vitamin K und 75% Kalium sowie kein Soja und keine Phytoestrogene.

Die Steroid-Gruppen (OVX+S, TP= 1M, 3M, 12M) erhielten alle 3 Wochen ein Dexamethason-21-isonicotinat 0,3 mg/kg KG s.c. (Voren® Depot, Fa. Böhlinger Ingelheim GmbH, Ingelheim, Deutschland). Die Steroidgabe wurde zwei Wochen postoperativ bei gesicherter Wundheilung begonnen und bis zu den Euthanasien weitergeführt. Die Tiere der Pilotgruppe erhielten hingegen Methylprednisolon (23 mg/kg KG täglich).

### 3.6 Tötung der Tiere

Nach Standzeiten von 0, 1, 3, 12 und 14 Monaten wurden die Tiere der jeweiligen Gruppen mittels CO<sub>2</sub>-Narkose schmerzlos getötet. Anschließend wurden die Ratten in überstreckte Rückenlage gebracht. Nun wurde die Bauchhöhle von ventral eröffnet, um zuerst Blut aus der Vena cava und anschließend die inneren Organe (Herz, Leber, Niere, Lunge, Milz) entnehmen zu können. Die so gewonnenen Proben wurden an die Gruppen der Teilprojekte des SFB/Transregio 79 weitergegeben.



**Abbildung 13: Präparation der Ratten-Wirbelsäule nach der Euthanasie.**

A) BWS und LWS im Verbund, B) + C) Wirbelkörper L3 nach Entfernung der Bandscheiben und des Wirbelbogens von ventral (B) und von dorsal (C).

Nun wurden die Extremitäten mit Schere und Skalpell abgetrennt und die Knochen präpariert. Abschließend wurde die Wirbelsäule als Ganzes entnommen (Abb. 13A). Die einzelnen Wirbelkörper wurden voneinander getrennt und von Bindegewebe, Bandscheiben und Rückenmark befreit. Teilweise wurde zusätzlich auch der Wirbelbogen entfernt, je nach Weiterverarbeitung der gewonnenen Knochenproben (Abb. 13B+C).

### 3.7 Herstellung der Paraffinschnitte

Um den Knochenmetabolismus sowohl auf zellulärer als auch auf interzellulärer Ebene besser analysieren zu können, mussten Paraffinschnitte angefertigt werden, an denen dann histologische, enzym- und immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden konnten.

Für die Herstellung der Paraffinschnitte wurden die bei den Euthanasien gewonnenen Knochenproben (Wirbelkörper L3) zunächst für 24 Stunden in 4%iger Paraformaldehydlösung in 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4 im Kühlschrank fixiert. Anschließend wurden die Proben sechsmal mit 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2-7,4 gespült und in Einbettungskassetten umgebettet. In diesen erfolgte die Entkalkung der Proben in 3,4%iger EDTA-/10%iger Tris-Lösung (Entkalkungszeit ca. 3 Wochen, Lösungswechsel alle zwei Tage). Nach dem Entkalken wurden die Proben eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült, danach in 70%igen Alkohol gelegt und daraufhin dem Paraffin-Einbettungsautomaten (Leica TP1050, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) zugeführt. Die jeweilige Verweildauer der Knochenproben in den unterschiedlichen Medien ist in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 2).

Medium	Dauer
70 % Alkohol	2 Stunden
80 % Alkohol	2,5 Stunden
96 % Alkohol	2 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
100 % Alkohol	3 Stunden
Xylol	60 Minuten
Xylol	45 Minuten
Xylol	45 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten
Paraffin	40 Minuten

Tabelle 2: Entwässerungsschema

Anschließend wurden die Proben in Metallförmchen umgebettet und das Paraffin auf einer Kälteplatte bei -20°C zum Erstarren gebracht. Die Herstellung der 5 µm dicken Paraffinschnitte erfolgte mit einem Rotationsmikrotom (Microm HM355S Coolcutsystem Fa. Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland). Die Schnitte wurden dann über eine Wasserrutsche einem 44°C warmen Wasserbad zugeführt. Dort wurden sie durch die Wärme ausgedehnt. Anschließend konnten die Paraffinschnitte auf mit APES (=3-Amino-propyltriethoxysilane) beschichtete Objektträger (Fa. R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) aufgebracht und dann bei 37°C im Wärmeschrank über Nacht getrocknet werden.

### 3.8 Toluidinblau-Färbung

Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung kann man die unterschiedliche Zusammensetzung des Gewebes deutlich erkennen und so einen guten Überblick gewinnen. Hierbei zeigt sich mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt bis blassblau, wohingegen Zellen, Zellkerne, Kollagenfasern, etc. verschiedene Blautöne annehmen und sich Knorpel beispielsweise metachromatisch rotviolett darstellt (Lang 2013).

#### ***Färbeprotokoll:***

1. Xylol	2 x 5 Minuten
2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.	je 2 – 5 Minuten
3. Toluidinblau O Färbelösung	10 – 60 Sekunden
4. Aufsteigende Alkoholreihe	je 2 – 5 Minuten
5. Xylol	2 x 5 Minuten
6. Eindecken mit DePex	

#### ***Färbelösungen:***

Toluidinblau O Lösung:

- Lösung A: 8 g Natriumtetraborat (Borax, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland), 8g Toluidinblau O (Fa. Chroma, Münster, Deutschland) und 800 ml Aqua dest.
- Lösung B: 2 g Pyronin G (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) und 200 ml Aqua dest.
- Lösung A und B jeweils 15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren
- Lösung A und B mischen, nochmals 15 Minuten auf dem Magnetrührer rühren, zweimal filtrieren
- Zur Färbung von Paraffinschnitten die Färbelösung 1 + 1 mit Aqua dest. verdünnen

Xylol (Fa. Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Deutschland), Ethanol vergällt (Fa. Stockmeier, Bielefeld, Deutschland), DePex (Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland)

### 3.9 Enzymhistochemie

Die Enzymhistochemie (EHC) ist ein Sammelbegriff für verschiedene histologische Färbemethoden, bei denen nach Aufbringen der Färbelösung durch die Aktivität der darzustellenden Enzyme unlösliche Farbstoffe entstehen. Dadurch können die Lokalisation sowie die Aktivität der Enzyme sichtbar gemacht werden. Da die Enzyme meistens von speziellen Zelltypen synthetisiert werden, kann mit Hilfe dieser Färbemethode auch Auskunft über deren Lokalisation und Anzahl gegeben werden.

#### 3.9.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase-Färbung (ALP-Färbung) dient der Darstellung der Osteoblastenaktivität, da Osteoblasten alkalische Phosphatase während der Knochenbildung produzieren. Als Färbelösung wurde BCIP/NBT Phosphatase Substrat verwendet. BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat) wird durch Abspaltung der Phosphatgruppe durch die alkalische Phosphatase in Bromchlorindoxyl überführt. Dabei wird ein Proton freigesetzt, das das gelbe NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu einem blau-violetten Diformazan reduziert, woraufhin beide Farbstoffe ausfallen und zu einer dunkelvioletten Färbung führen. (Lang 2013)

#### **Färbeprotokoll:**

- |   |               |
|---|---------------|
| 1. Entparaffinierung der Schnitte in Xylol                    | 2 x 5 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.                    | je 5 Minuten  |
| 3. 0,1 M Tris-Puffer pH 9,4                                   | 10 Minuten    |
| 4. Umkreisen der Schnitte mit einem Pap-Pen                   |               |
| 5. BCIP/NBT Phosphatase Substrat in feuchter Kammer bei 37 °C | 45 Minuten    |
| 6. Spülen mit Aqua dest.                                      |               |
| 7. Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat               | 10 Minuten    |
| 8. Spülen mit Aqua dest.                                      |               |
| 9. Aufsteigende Alkoholreihe                                  | je 5 Minuten  |
| 10. Xylol   | 2 x 5 Minuten |
| 11. Eindecken mit DePex                                       |               |

#### **Färbelösungen:**

Tris-Puffer: 121,1 g Tris (Trizma Base, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) auf 1 l Aqua dest. = 1 M, BCIP/NBT Phosphatase Substrat: fertiges Substrat (1-

Component, Fa. KPL, USA), Kernechtrot-Aluminiumsulfat: Fertiglösung (Fa. Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

### 3.9.2 Tartrat-resistente saure Phosphatase

Mit Hilfe dieser enzymhistochemischen Färbemethode wird die Aktivität der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (Tartrate resistant acid phosphatase=TRAP) sichtbar gemacht. TRAP wird von ein- und mehrkernigen Makrophagen und Osteoklasten synthetisiert und stellt somit einen Marker der Osteoklastenaktivität dar.

Die Substratlösung besteht aus Naphthol-AS-TR-Phosphat in N-N-Dimethylformamid (DMF) gelöst. Der Naphthylester wird durch TRAP enzymatisch zu Naphthol hydrolysiert, woraufhin das Naphthol mit Echtrotsalz (=Fast Red TR), einem Diazoniumsalz, reagiert und so ein Diazofarbstoff entsteht, der für eine rote Anfärbung sorgt. In der Substratlösung ist auch Na-Tartrat enthalten, das zur Hemmung von anderen, nicht tartratresistenten sauren Phosphatasen dient. (Lang 2013) Es wurden ungefärbte Paraffinschnitte des Wirbelkörpers L3 verwendet.

#### **Färbeprotokoll:**

- |  |               |
|--|---------------|
| 1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol        | 2 x 5 Minuten |
| 2. Absteigende Alkoholreihe bis Aqua dest.       | je 5 Minuten  |
| 3. 0,1 M Acetatpuffer pH 5,2                     | 10 Minuten    |
| 4. Einkreisen der Schnitte mit einem Pap-Pen     |               |
| 5. TRAP-Färbelösung in feuchter Kammer bei 37 °C | 50 Minuten    |
| 6. Spülen mit Aqua dest.                         |               |
| 7. Gegenfärben mit Methylgrün                    | 10 Minuten    |
| 8. Spülen mit Aqua dest., dreimal                |               |
| 9. Eindecken mit Kaisers Glycingelatine          |               |

#### **Färbelösungen:**

TRAP-Färbelösung:

- 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 125 µl N-N-Dimethylformamid (DMF) (Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- 25 ml 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 5,2
- 57,5 mg Natriumtartrat (di-Natriumtartrat-Dihydrid, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

- 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR Salt, Fa. Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA)

Methylgrün: 1 g Methylgrün (Fa. Fluka, Buchs SG, Schweiz) in 100 ml Aqua dest., 25 ml 100%iges Ethanol, Kaisers Glyceringelatine (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

#### **3.10 Immunhistochemie**

Durch immunhistochemische Färbungen (Immunhistochemie=IHC) können bestimmte Antigene auf Zellen oder in Geweben sichtbar gemacht werden. Hierbei bindet zunächst ein spezifischer primärer Antikörper (Primär-AK) an das gesuchte Antigen. Ein anschließend hinzugegebener biotinylierter sekundärer Antikörper (Sekundär-AK) bindet nun an den Primär-AK. Daraufhin wird ein Avidin-Biotin-Komplex hinzugegeben, der an den Sekundär-AK bindet und nach Zugabe eines Chromogens/Substrats eine Farbreaktion hervorruft, wodurch das Antigen markiert wird. (Lüllmann-Rauch 2006)

##### ***Allgemeines Färbeschema der IHC***

Abhängig vom Primär-AK war teilweise eine Vorbehandlung der Schnitte mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C über eine Stunde notwendig, um so eine Antigendemaskierung zu erreichen. Anschließend wurde die endogene Peroxidase blockiert. Eine Serumblockade zur Blockierung aller unspezifischen Bindungsstellen und Verhinderung einer Hintergrundfärbung war nicht notwendig, da die Primär-AK in einem den Hintergrund reduzierenden Verdünnungspuffer (VP) angesetzt wurden (Antibody Diluent, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland). Nun wurden die Primär-AK auf die Schnitte gegeben (Tab. 3), damit sie während einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht spezifisch an die jeweiligen Antigene binden konnten. Anschließend erfolgte die Zugabe eines gegen den Primär-AK gerichteten biotinylierten Sekundär-AKs, an den wiederum ein daraufhin hinzugegebener Avidin-Biotin-Komplex (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) band. Nach Zugabe eines Substrates/Chromogens (NovaRED Phosphatase Substrate Kit, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) konnte der gebundene AB-Komplex das Substrat/Chromogen umsetzen und so das gesuchte Antigen farblich markiert werden. Abschließend erfolgte noch eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (20 Sekunden bis 2 Minuten, optimal 30 Sekunden), um das Gewebe besser darzustellen.

Es wurden jeweils parallel auch Negativkontrollen durchgeführt, in der lediglich VP auf die Schnitte gegeben wurde. Sofern möglich erfolgte zusätzlich eine Präabsorption,



wobei bereits am Vortag das Antigen im Überschuss mit dem Primär-AK gemischt und am Folgetag als Negativkontrolle auf die Schnitte aufgetragen wurde.

#### **Färbeprotokoll:**

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol	2 x 5 Minuten
2. technisches Azeton	10 Minuten
3. technisches Azeton + WP (1+ 1)	10 Minuten
4. WP, zweimal	
5. Vorverdau (wenn nötig, abhängig von Primär-AK)	
6. WP, zweimal	
7. Blockierung der endogenen Peroxidase: 3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in WP	5 Minuten
8. WP, zweimal	
9. Serumblockade (falls nötig)	20 Minuten
10. Primär-AK	je nach AK
11. WP, dreimal	
12. Sekundär-AK (biotinyliert)	30 Minuten
13. WP, zweimal	
14. Avidin-Biotin-Komplex	30 Minuten
15. WP, zweimal, Aqua dest.	
16. Nova Red (Peroxidase Substrat Kit)	5 Minuten
17. Bidest, Aqua dest. dreimal	
18. Gegenfärbung mit Hämatoxylin	30 Sekunden
19. Aufsteigende Alkoholreihe	je 4-5 Minuten
20. Xylol	2 x 5 Minuten
21. Eindecken mit DePex	

#### **Färbelösungen:**

TBS (Tris-NaCl)-Puffer:

Stammlösung: 60,57 g Tris Base + 87,66 g NaCl in 1000 ml Aqua dest.,  
pH mit 25% Salzsäure auf 7,4 einstellen

TBS – Puffer: Stammlösung 1:10 mit Aqua dest. verdünnen

Tris-Waschpuffer (WP):

TBS-Puffer pH 7,4 + 0,025% Triton-X-100:

100 ml Stammlösung + 900 ml Aqua dest. + 0,25 ml Triton-X-100

(Tris-Pufferan, Fa. Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland;

Triton-X-100, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

BSA (Bovine Serum Albumin, Fa. Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland):

1% BSA in TBS: 1 g BSA in 100 ml TBS

Primär – AK	Spezies	Firma	Verdünnung	Vorverdau
Anti-Biglycan	Goat polyclonal	Abcam ab58562	1 : 50 4°C ü Nacht	kein
Anti-Carboanhydrase 2	Rabbit polyclonal	Acris Antibodies AP20569PU-N	1 : 100 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h
Anti-Fibronectin	Mouse monoclonal	Acris Antibodies DM300	1 : 50 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h
Anti-MMP9 [EP1254]	Rabbit monoclonal	Abcam ab76003	1 : 100 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h
Anti-MMP14 [EP1264Y]	Rabbit monoclonal	Abcam ab51074	1 : 100 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h
Anti-human Osteocalcin	Mouse monoclonal	R&D Systems MAB1419	1 : 100 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h
Anti-Tenascin C [EPR4219]	Rabbit monoclonal	Abcam ab108930	1 : 500 RT 1 h	Cit. 60°C 1 h

**Tabelle 3: Primär-Antikörper**

Präabsorption:

Anti-Biglycan 1:50 + Biglycan Peptid 1:25, Inkubation bei 4°C über Nacht, zentrifugieren, Überstand entnehmen (Biglycan peptide ab119271, Fa. Abcam, Cambridge, UK)

Sekundär-AK:

(1) biotinylated anti goat IgG 1:800 (made in rabbit, Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland):

1 µl AK + 100 µl Rattenserum + 699 µl 1% BSA in TBS

(2) biotinylated anti mouse IgG 1:100 bzw. 1:150 (made in horse, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA):

1 µl AK + 12,5 µl Rattenserum + 86,5 µl 1% BSA in TBS bzw.

1 µl AK + 18,75 µl Rattenserum + 130,25 µl 1% BSA in TBS

(3) biotinylated anti rabbit IgG 1:500 (made in goat, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA):

1 µl AK + 62,5 µl Rattenserum + 436,5 µl 1% BSA in TBS

AB-Komplex (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA):

500 µl TBS + 9 µl Reagent A + 9 µl Reagent B, 30 Minuten vor Gebrauch ansetzen

AB-Substrat (NovaRED Phosphatase Substrate Kit, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA):

---

5 ml Aqua dest.	+ 3 Tropfen Reagenz 1	→ vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 2	→ vortexen
	+ 2 Tropfen Reagenz 3	→ vortexen
	+ 2 Tropfen Hydroperoxydase	→ vortexen

### 3.10.1 Immunhistochemische Färbung knochenanaboler Proteine

#### ***Biglycan***

Biglycan ist ein kleines leucinreiches Proteoglykan, das die Kollagensynthese mitreguliert. Es war keine Vorbehandlung zur Demaskierung der Antigene notwendig. Als Primär-AK wurde goat polyclonal to Biglycan (ab58562, Fa. Abcam, Cambridge, UK) verwendet, der in DAKO diluent verdünnt wurde (Tab. 3). Als Sekundär-AK wurde ein biotinylierter anti goat IgG (made in rabbit, Fa. DAKO, Hamburg, Deutschland) benutzt.

#### ***Fibronectin***

Fibronectin ist ein Adhäsionsmolekül, das verantwortlich ist für die Integration von Zellen in der Extrazellulärmatrix und zudem eine Rolle spielt bei der Differenzierung von Osteoblasten. Zur Demaskierung der Antigene wurden die Schnitte eine Stunde lang mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C vorbehandelt, bevor dann die Inkubation mit dem Primär-AK mouse monoclonal to Fibronectin (DM300, Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) erfolgte (Tab. 3). Ein biotinylierter anti mouse IgG 1:100 (made in horse, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) diente als Sekundär-AK.

#### ***Osteocalcin***

Osteocalcin wird von Osteoblasten synthetisiert, ist Teil der extrazellulären nicht-kollagenen Knochenmatrix und gilt als Marker des Knochenaufbaus. Auch hier erfolgte ein Vorverdau mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C. Als Primär-AK wurde mouse monoclonal to human Osteocalcin (MAB1419, Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) genutzt (Tab. 3), der mit Hilfe von biotinylierten anti mouse IgGs 1:150 (made in horse, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) markiert wurde.

#### ***Tenascin C***

Tenascin C ist ein von Osteoblasten sezerniertes Glykoprotein, das wichtig ist für Wachstum und Differenzierung von Osteoblasten. Zur Antigendemaskierung war eine Vorbehandlung mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C für eine Stunde notwendig, bevor die

Inkubation mit rabbit monoclonal to Tenascin C [EPR4219] (ab108930, Fa. Abcam, Cambridge, UK) erfolgen konnte (Tab. 3). Anschließend wurde ein biotinylierter anti rabbit IgG (made in goat, Fa. Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) als Sekundär-AK genutzt.

#### **3.10.2 Immunhistochemische Färbung knochenkataboler Proteine**

##### ***Carboanhydrase 2***

Die Carboanhydrase 2 ist ein zytosolisches Enzym der Osteoklasten und wirkt entscheidend bei der Knochenresorption mit. Zur Demaskierung der Antigene erfolgte eine Vorbehandlung mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C für eine Stunde. Anschließend erfolgte die Inkubation mit rabbit polyclonal to Carboanhydrase 2 (AP20569PU-N, Fa. Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland) (Tab. 3). Als Sekundär-AK diente ein biotinylierter anti rabbit IgG (made in goat, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA).

##### ***MMP-9***

MMP-9 gehört zur Familie der Matrixmetalloproteinasen und wird von Osteoklasten gebildet, um dann entscheidend am Abbau der Extrazellulärmatrix, insbesondere von Kollagen, mitzuwirken. Auch hier erfolgte eine Vorbehandlung der Schnitte mit Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C für eine Stunde, woraufhin dann der Primär-AK rabbit monoclonal to MMP9 [EP1254] (ab76003, Fa. Abcam, Cambridge, UK) auf die Paraffinschnitte gegeben wurde (Tab. 3). Anschließend markierte ein biotinylierter anti rabbit IgG (made in goat, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) die Primär-AKs.

##### ***MMP-14***

MMP-14 gehört ebenfalls zu den Matrixmetalloproteinasen und befindet sich auf der Zellmembran der Osteoklasten im Bereich der Haftzonen. Eine Stunde lang wurden die Paraffinschnitte in Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C gegeben, um die Antigene zu demaskieren. Danach konnten die Primär-AK rabbit monoclonal to MMP14 [EP1264Y] (ab51074, Fa. Abcam, Cambridge, UK) an die Antigene binden (Tab. 3) und selbst wiederum mit Hilfe biotinylierter anti rabbit IgGs (made in goat, Fa. Vector Laboratories, Burlingame, USA) gekennzeichnet werden.

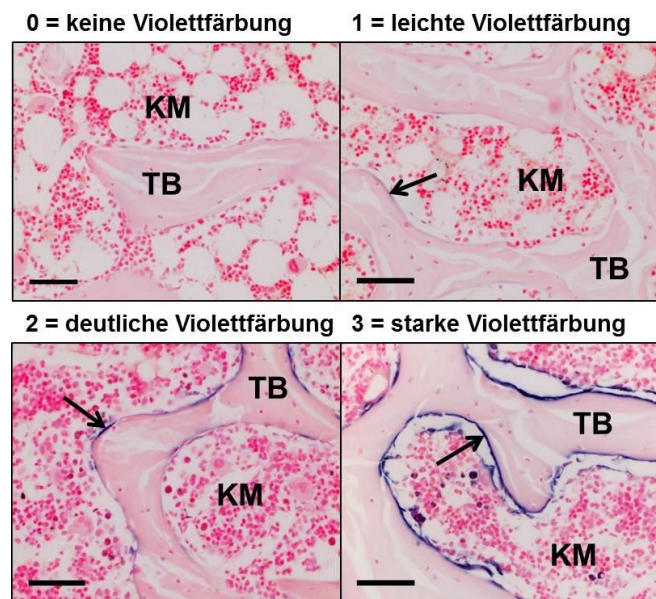
#### **3.11 Auswertung der Enzymhistochemie**

Zunächst wurden die gefärbten Schnitte an einem Fotomikroskop (Axioplan 2, Fa. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) mit einer Digitalkamera (Leica DC 500, Fa. Leica Microsystems, Bensheim, Deutschland) im Labor für Experimentelle

Unfallchirurgie fotografiert und dann mit Hilfe der Mikroskopsoftware Axio Vision (Fa. Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) digitalisiert. Es wurden jeweils sowohl Übersichts- als auch Detailaufnahmen angefertigt (Vergrößerungen 2.5x, 5x, 10x, 20x, 40x, 100x). Anschließend erfolgte die Bearbeitung der Fotos mit Adobe Photoshop CS 3 Extended (Fa. Adobe Systems Incorporated).

### 3.11.1 Deskriptive Auswertung

Bei der deskriptiven Auswertung der enzymhistochemisch gefärbten Schnitte wurde neben der Kortikalis insbesondere auf die Trabekel geachtet. Es wurden deren Anzahl, Dicke und Beschaffenheit betrachtet, wobei die Trabekeloberfläche mit den gefärbten Zellen von noch größerem Interesse war. Hierbei wurden die Zahl und die Morphologie der Zellen sowie bei der Alkalischen Phosphatase-Färbung zusätzlich die Färbeintensität analysiert. Dies war bei der TRAP-Färbung nicht nötig, da sie sich dort sehr einheitlich zeigte. Zur besseren Beurteilbarkeit der Färbeintensität wurden Zahlenwerte von 0 (=keine Violett-färbung) bis 3 (=starke Violett-färbung) vergeben, wobei man sich an folgender Vorlage orientierte (Abb. 14):



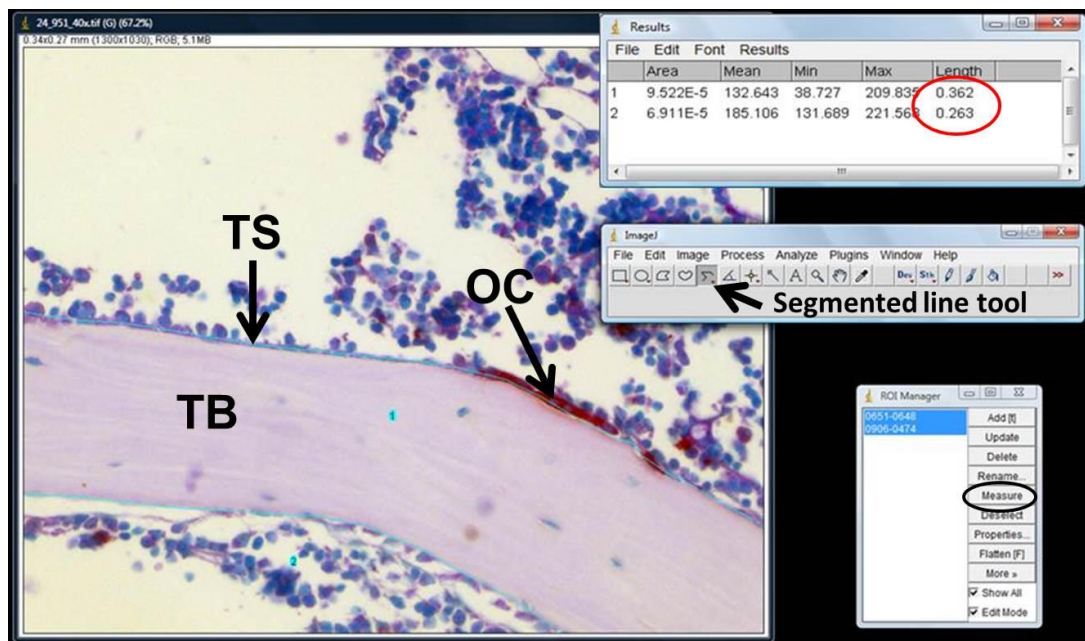
**Abbildung 14: Beurteilung der Färbeintensität der ALP-Färbung.**

Die gefärbten Paraffinschnitte des Wirbelkörpers L3 zeigten selten gar keine Violett-färbung (0) und somit keine ALP-Aktivität, meistens zeigte sich eine leichte (1), deutliche (2) oder starke (3) Violett-färbung als Hinweis auf eine ALP-Aktivität der Osteoblasten (Pfeile weisen auf Violett-färbung, KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=40 µm).

### 3.11.2 Semiautomatisierte Auswertung mit ImageJ

Zunächst wurden sechs Tiere pro Gruppe ausgewählt, von denen jeweils ein Paraffinschnitt des Wirbelkörpers L3 mit den unterschiedlichen Färbemethoden gefärbt

wurde. Anschließend wurde die Mitte der Wirbelkörper aufgesucht und in diesem Bereich in der Vergrößerung 40x jeweils 15 Fotos pro Paraffinschnitt mit Hilfe eines Fotomikroskops gemacht. Die digitalisierten Fotos wurden mit Photoshop bearbeitet. Die quantitative Analyse der Enzymhistochemie erfolgte mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Hierbei wurde nach Öffnen der Fotos und Einstellen des Maßstabes mit Hilfe des Segmented Line-Tools die Trabekeloberfläche markiert. Die markierten Trabekeloberflächen wurden dem ROI-Manager hinzugefügt, gespeichert und ausgemessen (Abb. 15). Die gemessenen Längen konnten in eine Excel-Tabelle kopiert und dort weiter verwendet werden.



**Abbildung 15: Semiautomatisierte Auswertung der Enzymhistochemie mit ImageJ.**

Dargestellt anhand eines TRAP-gefärbten Paraffinschnittes des Wirbelkörpers L3, Vergrößerung 40x: Nach Einstellen des Maßstabes bei ImageJ Messen der trabekulären Oberfläche mithilfe des Segmented line tools, Festhalten der gemessenen Strecken im ROI-Manager: durch Anklicken von „Measure“ (schwarz umrandet) erhält man die Ergebnisse in Form einer Längenangabe in mm (rot umkreist), die anschließend in eine Excel-Tabelle kopiert werden und weiterverwendet werden können (OC=Osteoklast, TB=trabekulärer Knochen, TS=Trabekuläre Oberfläche).

Danach wurde zusätzlich in jedem Foto die rot (TRAP) bzw. violett (ALP) gefärbte Trabekeloberfläche markiert und ausgemessen sowie die Osteoklasten (TRAP-Färbung) ausgezählt. Als Osteoklast zählten alle TRAP-positiven, mehrkernigen Zellen, die sich auf der Trabekeloberfläche befanden. Die Osteoblasten (ALP-Färbung) konnten leider nicht separat ausgezählt werden, da sie nicht eindeutig erkennbar waren. Die gefärbte Trabekeloberfläche sowie die Osteoklastenanzahl wurden zur gesamten Trabekeloberfläche ins Verhältnis gesetzt.

Zunächst wurden aus den ermittelten Werten der 15 Fotos pro Paraffinschnitt Mittelwerte für jedes Tier gebildet, die dann mit der Statistik-Software SPSS (IBM SPSS Statistics 20, Fa. IBM, Ehningen, Deutschland) ausgewertet wurden.

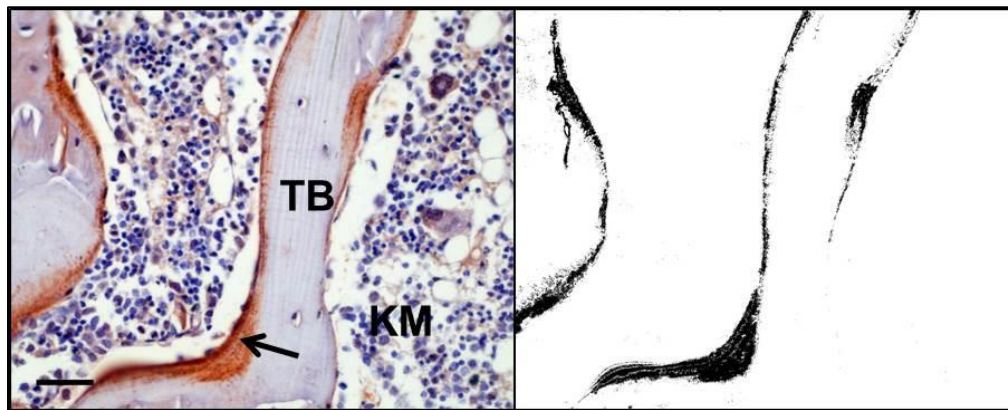
### 3.12 Auswertung der Immunhistochemie

#### 3.12.1 Deskriptive Auswertung

Bei der deskriptiven Analyse der immunhistochemischen Färbungen wurde die Färbung der Kortikalis betrachtet sowie die des trabekulären Knochens und des Knochenmarks. Bei der Betrachtung der Kortikalis und des trabekulären Knochens wurde jeweils die Übersicht beschrieben sowie die Beschaffenheit und Färbung der Knochenoberfläche, der Extrazellulärmatrix und der direkten Umgebung der Osteozyten. Im Knochenmark interessierten die dortigen Zellen und deren Anfärbbarkeit sowie die Anzahl der Fettvakuolen.

#### 3.12.2 Semiautomatisierte Auswertung mit GIMP und ImageJ

Bei der quantitativen Analyse der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Biglycan wurden die Bildbearbeitungsprogramme ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) und GIMP (GNU Image Manipulation Program, Fa. The GIMP Team) verwendet.



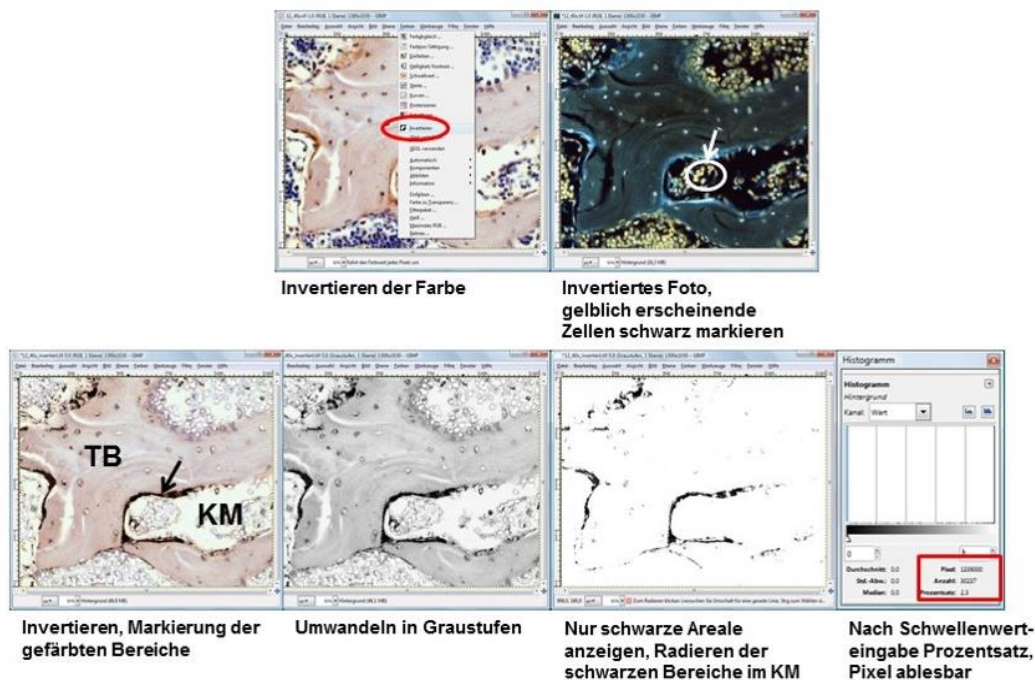
**Abbildung 16: Analyse der gefärbten Trabekelfläche mit GIMP.**

Links: Mit Anti-Biglycan gefärbter Paraffinschnitt des Wirbelkörpers L3, rechts: gefärbte Trabekelfläche nach Markierung mit GIMP (Pfeil: BGN-positiver Bereich, KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=40 µm).

Wie bereits bei der Auswertung der Enzymhistochemie beschrieben, wurden pro Gruppe 6 Tiere ausgewählt, von denen jeweils ein Paraffinschnitt des Wirbelkörpers L3 gefärbt und 15 Fotos in der Vergrößerung 40x vom Zentrum des Wirbelkörpers gemacht wurden. Zunächst wurde die gesamte Trabekelfläche mit ImageJ umrandet und ausgemessen. Anschließend erfolgte die Markierung und Messung der gefärbten



Trabekelfläche mit GIMP (Abb. 16+17). Die gefärbte Trabekelfläche wurde zur Gesamttrabekelfläche ins Verhältnis gesetzt und pro Tier ein Mittelwert ermittelt. Diese wurden mittels SPSS statistisch ausgewertet.



**Abbildung 17: Semiautomatisierte Auswertung der IHC mit GIMP.**

Zu Beginn Invertieren der Farbe (rot umrandet), Schwärzen der gelblich erscheinenden Zellen des Knochenmarks (weiß eingekreist), erneutes Invertieren und Schwärzen und Markieren der immunhistochemisch gefärbten Bereiche (Pfeil), Umwandeln des Fotos in Graustufen, nur die schwarzen Bereiche anzeigen lassen, Ausradieren der schwarzen Bereiche im Knochenmark. Nun kann nach Schwellenwerteingabe der Prozentsatz der gefärbten Fläche von der Gesamtfläche sowie die dazugehörigen Pixel abgelesen werden (roter Kasten) und mit Hilfe dieser Angaben und der zuvor mit ImageJ gemessenen Trabekelfläche der Anteil gefärbter Trabekelfläche pro Gesamttrabekelfläche errechnet werden (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen).

### 3.13 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der bei der Auswertung der enzym- und immunhistochemischen Färbungen gewonnenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software SPSS (IBM SPSS Statistics 20, Fa. IBM, Ehningen, Deutschland). Es fand ein Vergleich mehrerer Parameter innerhalb der Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten sowie zwischen den Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten statt. Da bei den ermittelten Werten nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde zur Datenanalyse der Post-Hoc-Test nach Games-Howell durchgeführt. Hierbei erfolgte der Vergleich von Mittelwertpaaren. Lagen lediglich zwei verschiedene Gruppen zu einem Zeitpunkt vor, wurde der Mann-Whitney-U-Test benutzt, der sich zum Vergleich zwei verschiedener Stichproben eignet ohne eine Normalverteilung vorauszusetzen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p=0,05$  festgelegt.



Zu den betrachteten Parametern zählten bei der Enzymhistochemie die Gesamttrabekeloberfläche (TTS=total trabecular surface), die Osteoklastenanzahl (=OC Nr.) pro TTS und die gefärbte Trabekeloberfläche (STS=stained trabecular surface) pro TTS. Bei der quantitativen Analyse der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Biglycan wurde insbesondere die gefärbte Trabekelfläche (STA=stained trabecular area) pro Gesamttrabekelfläche (TTA=total trabecular area) betrachtet.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurden mit Hilfe von SPSS Balkendiagramme erstellt, die die Mittelwerte sowie den Fehlerbalken (+/- einen Standardfehler anzeigend) abbilden.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 Minderung der Knochenqualität durch Multidefizienzdiät oder Steroidbehandlung**

Die Färbung mit Toluidinblau ist eine Standardfärbemethode, um Veränderungen verschiedener Knochenparameter zu erkennen. Sie wurde an Paraffinschnitten des Wirbelkörpers L3 durchgeführt, um grobe Unterschiede der kortikalen und trabekulären Beschaffenheit der Knochen zu den verschiedenen Zeitpunkten und zwischen den Gruppen zu erkennen. Bei der Toluidinblau-Färbung stellt sich mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt bis blassblau da. Zellen, Zellkerne, Kollagenfasern, usw. erscheinen in verschiedenen Blautönen, wohingegen Knorpel metachromatisch rotviolett ist.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe zeigte sich nach einer Standzeit von 0 Monaten (TP=0M) eine glatt begrenzte, solide Kortikalis bei einer stark vernetzten Spongiosa mit relativ schlanken Trabekeln. Diese zeigten vor allem in der Umgebung der Wachstumsfugen kleine, violette, unmineralisierte Bereiche. Bei der Betrachtung des zellreichen Knochenmarks sah man kaum Fettvakuolen.

Die Sham-Gruppe hatte nach einer Standzeit von 3 Monaten eine glatt begrenzte, solide Kortikalis mit zahlreichen, selbst in niedriger Vergrößerung deutlich erkennbaren Osteozyten. Das Trabekelwerk war vor allem kranial und kaudal stark vernetzt mit wenigen, kleinen, unmineralisierten Bereichen. Im Knochenmark waren kaum Fettvakuolen auszumachen, jedoch viele Zellen.

Zum Zeitpunkt 12M wirkte die Kortikalis der Sham-Gruppe immer noch recht massiv und glatt begrenzt und auch das Trabekelwerk war weiterhin stark vernetzt. Vor allem

in der Mitte des Wirbelkörpers befanden sich viele Fettvakuolen, während die Knochenmarkszellen eher randständig anzutreffen waren.

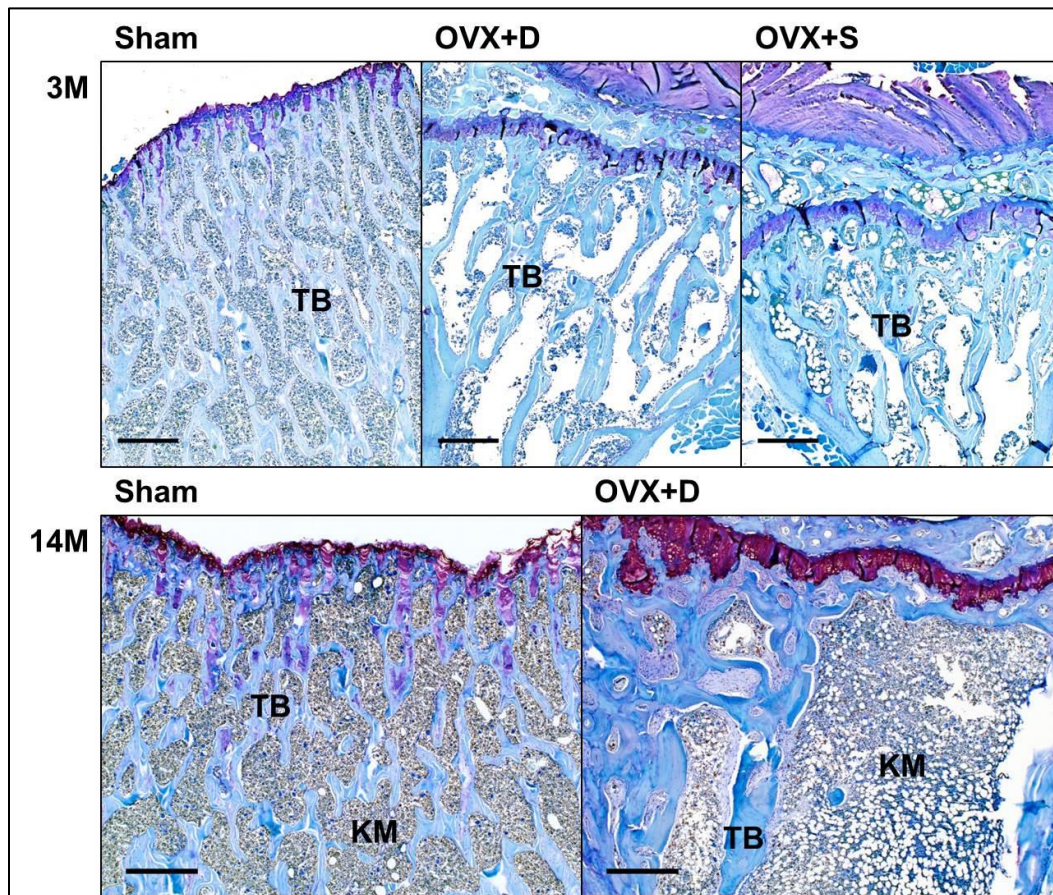
Auch nach einer Standzeit von 14 Monaten konnte man in der Sham-Gruppe noch ein stark vernetztes Trabekelwerk erkennen mit minimal weniger Trabekeln mittig. Die Kortikalis wirkte kräftiger im Vergleich zu den Trabekeln. Sowohl Kortikalis als auch Spongiosa zeigten teilweise eine Violett- bzw. Türkisfärbung, insbesondere die direkte Umgebung der Osteozyten war violett gefärbt. Im Knochenmark waren viele Zellen und zentral einige Fettvakuolen zu sehen.

Nach drei Monaten Standzeit verfügten die mit OVX+D behandelten Tiere ebenfalls über eine weitgehend glatt begrenzte, stabile Kortikalis, die lediglich an kleinen Stellen etwas dünner wirkte und zu den Seiten hin konkav gewölbt war. Bei Betrachtung des spongiösen Knochens konnten deutlich weniger vernetzte, relativ schmale, zentral rarefizierte Trabekel im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden (Abb. 18).

Die Trabekel waren zum Zeitpunkt 12M deutlich verdickt, sodass sie teilweise der Kortikalis entsprachen bzw. an einigen Stellen sogar breiter wirkten. Sie befanden sich überwiegend am Rand des Wirbelkörpers und zeigten sich teilweise rosa, türkis oder dunkelblau gefärbt.

Nach einer Standzeit von 14 Monaten waren die Trabekel der Diätgruppe ähnlich breit wie die Kortikalis und kaum vernetzt sowie vorwiegend am Rand des Wirbelkörpers gelegen (Abb. 18). Sie zeigten sich farblich von türkis über violett bis dunkelblau, wobei die violette Färbung überwiegend in der unmittelbaren Umgebung der Osteozyten nachzuweisen war. Viele Stellen des Trabekelwerks wiesen eine streifige Zeichnung auf. Dies alles sind deutliche Zeichen einer schlechten Mineralisierung des Knochens und somit einer minderen Knochenqualität. Intertrabekulär befanden sich bindegewebig wirkende Bereiche und im Knochenmark konnte man viele Fettvakuolen ausmachen.

Die Kortikalis der steroidbehandelten Tiere entsprach nach 3M weitestgehend der Gruppe OVX+D, wirkte stellenweise jedoch etwas verdickt. Auch das Trabekelwerk ähnelte dem der Diät-Gruppe, wobei die Trabekel dünner wirkten und im Knochenmark deutlich mehr Fettvakuolen sowie weniger Zellen zu finden waren (Abb. 18).



**Abbildung 18: Unterschiede in der trabekulären Beschaffenheit im osteoporotischen Knochen.**

Mit Hilfe der Toluidinblau-Färbung konnten Unterschiede in der trabekulären Beschaffenheit des Wirbelkörpers L3 der verschiedenen Gruppen aufgedeckt werden. So zeigte sich nach 3M Standzeit bei der Sham-Gruppe ein stark verzweigtes Trabekelwerk, wohingegen bei OVX+D und OVX+S schon deutlich weniger vernetzte, schmalere, zentral rarefizierte Trabekel im Vergleich zur Sham-Gruppe auffielen.

Auch nach 14M zeigte sich bei der Sham-Gruppe ein stark vernetztes Trabekelwerk mit lediglich mittig etwas weniger Trabekeln. Bei den Tieren der Diätgruppe fielen die wenigen, deutlich verdickten Trabekel auf, die sich überwiegend am Rand des Wirbelkörpers befanden. Zudem zeigten sich in der Spongiosa viele schlecht bis gar nicht mineralisierte Bereiche (violett/türkis gefärbt) (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=400µm).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die Multidefizienzdiät als auch die Steroidbehandlung Auswirkungen auf den kortikalen, aber insbesondere auf den spongiosen Knochen der Rattenwirbelkörper hatten. Nach einer Standzeit von 3 Monaten zeigte sich eine deutlichere Veränderung des trabekulären Knochens durch die Steroide als durch die Diät. Eine mindere Qualität des trabekulären Knochens konnte vor allem bei den Ratten beobachtet werden, die zuvor über 12M bzw. 14M eine Multidefizienzdiät erhielten (Abb. 18).

Um den zellulären Metabolismus, der zu diesen Veränderungen führte, näher zu untersuchen, wurde die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität mit Hilfe von Enzymhistochemie (EHC) analysiert.

## **4.2 Zelluläres Ungleichgewicht durch Ansprechen der Behandlung**

Bei der Auswertung der enzymhistochemischen Färbungen wurde neben der gefärbten trabekulären Oberfläche (STS=stained trabecular surface) auch die gesamte trabekuläre Oberfläche (TTS=total trabecular surface) bestimmt.

Somit konnten einerseits Aussagen zur Gesamttrabekeloberfläche als auch zu den unterschiedlichen Anteilen gefärbter pro gesamter trabekulärer Oberfläche (STS/TTS) zwischen den verschiedenen Gruppen sowie innerhalb der Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten getroffen werden.

### **4.2.1 Erhöhte Osteoblastenaktivität durch Multidefizienzdiät und Steroide**

Die alkalische Phosphatase (ALP) ist ein von Osteoblasten in der Phase der Kollagenreifung abgegebenes Enzym, das als Marker der Osteoblastenaktivität gilt.

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich eine relativ starke Osteoblastenaktivität mit einer deutlichen Violettfärbung der Trabekeloberfläche. Die stained trabecular surface/total trabecular surface (STS/TTS) lag im Mittel bei einem Prozentwert von 0,44.

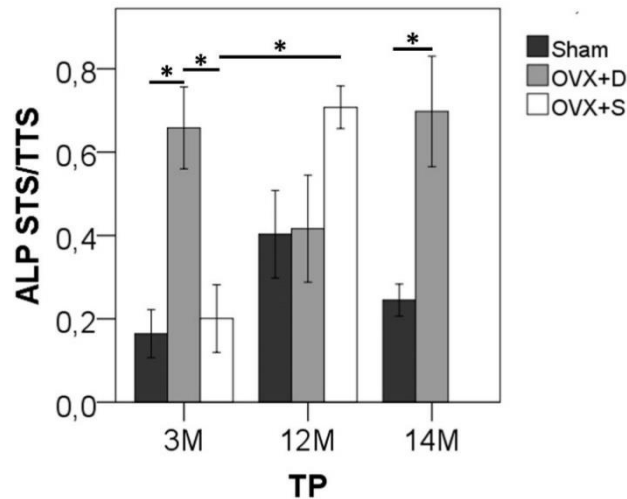
Zum TP=3M waren bei der Sham-Gruppe im Mittel 16,4% der Trabekeloberfläche violett gefärbt. Von 3M zu 12M war ein deutlicher Anstieg der Osteoblastenaktivität zu verzeichnen. Die STS/TTS lag hier bei der Sham-Gruppe im Mittel bei 0,40 bei überwiegend deutlicher Violettfärbung, nach 14M war sie nur noch bei 0,24 bei ebenfalls deutlicher Farbreaktion.

In der Gruppe OVX+D war zum TP=3M die Osteoblastenaktivität sehr hoch, sodass für STS/TTS ein Wert von 0,66 erreicht wurde (Abb. 19). Die ALP-Färbung war hier deutlich bis sehr stark erkennbar. Nach einer Standzeit von 12 Monaten lag die STS/TTS nur noch bei 0,42. Die Färbung in der Diätgruppe war sehr heterogen: teilweise war sie sehr deutlich, teilweise nur schwach bis gar nicht erkennbar.

Im weiteren Verlauf war ein erneuter deutlicher Anstieg der Osteoblastenaktivität zu verzeichnen, sodass die STS/TTS nach 14M im Mittel auf einen Höchstwert von 0,70 stieg und die Farbreaktion deutlich bis sehr stark ausfiel.

In der Gruppe OVX+S konnte nach drei Monaten Standzeit für STS/TTS ein Wert von 0,20 ermittelt werden. Bei der Pilotgruppe mit Methylprednisolon (OVX+MP) war die Osteoblastenaktivität etwas geringer und im Mittel waren nur 12,7% der Trabekeloberfläche gefärbt.

Von 3M zu 12M zeigte sich mit  $p=0,002$  ein signifikanter Anstieg der Osteoblastenaktivität bei OVX+S (Abb. 19). Hier waren 70,8% der Trabekeloberfläche deutlich violett gefärbt.



**Abbildung 19: Quantitative Auswertung der enzymhistochemisch ermittelten Osteoblastenaktivität.** Zunächst Aktivitätsanstieg bei Sham hin zu 12M, anschließend Aktivitätsabfall. Bei OVX+D erhöhte Osteoblastenaktivität nach 3M und 14M, nicht jedoch nach 12M. Signifikanter Anstieg der Osteoblastenaktivität bei OVX+S von 3M auf 12M. Größte Unterschiede zwischen den Gruppen nach einer Standzeit von 3M: Signifikant höhere Osteoblastenaktivität bei OVX+D im Vergleich zu den anderen Gruppen (STS/TTS=gefärbte/Gesamttrabekeloberfläche, TP=Standzeit, \*=  $p \leq 0.05$ , Games-Howell bzw. zum TP=14M Mann-Whitney-U,  $n=6$  pro Zeitpunkt/Gruppe).

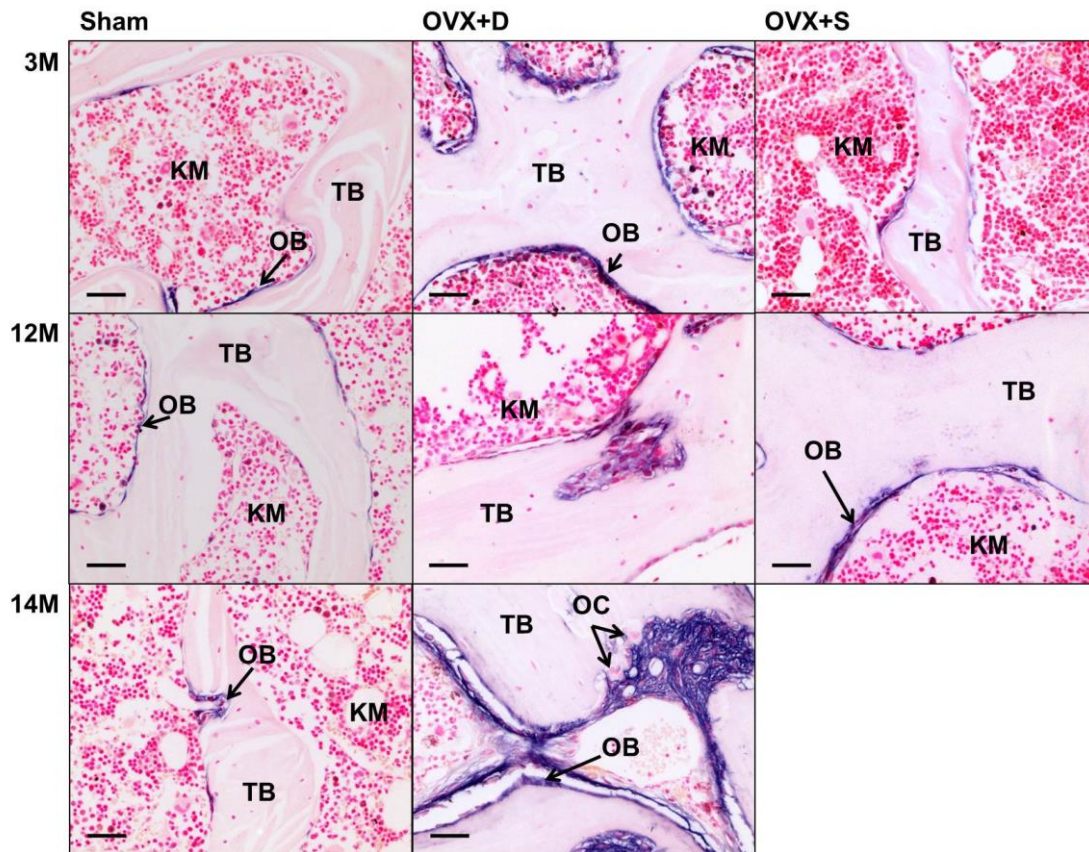
#### **Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten**

Nach einer Standzeit von einem Monat waren die Ergebnisse innerhalb der Gruppen sehr heterogen. In jeder Gruppe waren Tiere, bei denen ein Großteil der Trabekeloberfläche violett gefärbt war, genau wie andere Tiere, bei denen sich kaum bis keine gefärbten Bereiche darstellen ließen. Tendenziell zeigte die Sham-Gruppe die größte Osteoblastenaktivität, wobei diese Ergebnisse nur eingeschränkt verwertbar waren.

Zum Zeitpunkt 3M war die Osteoblastenaktivität bei OVX+D signifikant höher im Vergleich zur Sham-Gruppe ( $p=0,010$ ) sowie im Vergleich zu OVX+S ( $p=0,023$ ) und OVX+MP ( $p=0,009$ ) (Abb. 19+20).

Nach einer Standzeit von 12 Monaten gab es bei der Sham-Gruppe und der Diätgruppe keine großen Unterschiede der Mittelwerte für STS/TTS. Eine im Vergleich zu den anderen Gruppen deutlich erhöhte Osteoblastenaktivität zeigte sich bei OVX+S. Nach 14 Monaten konnte erneut ein sehr deutlicher Unterschied in der Osteoblastenaktivität zwischen der Sham-Gruppe und OVX+D festgestellt werden, wie in Abbildung 20 erkennbar.





**Abbildung 20: Enzymhistochemische Darstellung der Osteoblastenaktivität.**

Mit Hilfe der ALP-Färbung konnte die Osteoblastenaktivität dargestellt werden. Bei der Sham-Gruppe zeigte sich nach 12M eine höhere Osteoblastenaktivität als nach 3M, die generell jedoch niedriger war als bei OVX+D. Die Diätgruppe zeigte nach 3M und 14M eine deutlich höhere Osteoblastenaktivität im Vergleich zu 12M. Bei OVX+S war nach 12M die Osteoblastenaktivität signifikant höher als nach 3M. Bei OVX+D zeigte sich zum Zeitpunkt 3M, bei OVX+S nach 12M die höchste Osteoblastenaktivität (KM=Knochenmark, OB=Osteoblast, OC=Osteoklast, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=40 µm).

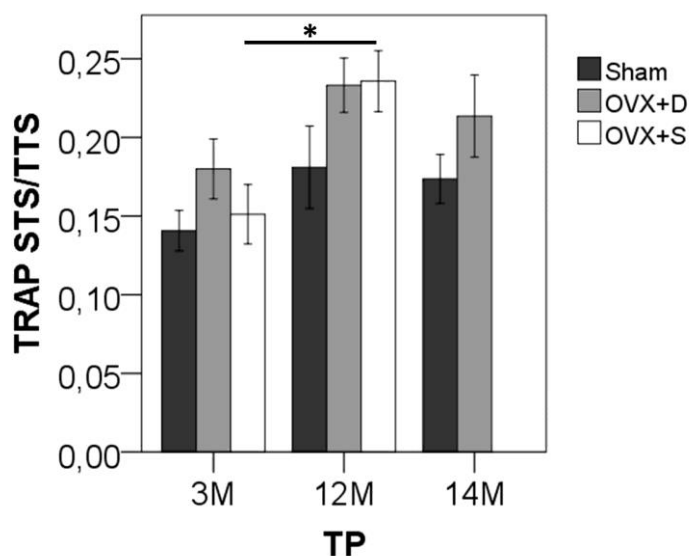
#### 4.2.2 Erhöhte Osteoklastenaktivität und reduzierte Trabekeloberfläche durch Multidefizienzdiät und Steroide

Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (=TRAP) ist ein von Osteoklasten produziertes Enzym, das eine entscheidende Rolle beim Abbau der organischen Knochenmatrix spielt und somit als Marker für die Osteoklastenaktivität gilt.

Bei der Kontrollgruppe zeigte sich mit einer STS/TTS von 0,11 eine im Vergleich zu den anderen Gruppen zu späteren Standzeiten etwas geringere Osteoklastenaktivität. Bei der Sham-Gruppe war das Ergebnis der TRAP-Färbung nach einer Standzeit von einem Monat relativ heterogen, im Mittel kam ein Wert von 0,10 STS/TTS heraus, der allerdings nur eingeschränkt verwertbar war. Nach einer Standzeit von 3 Monaten lag die STS/TTS bei der Sham-Gruppe im Mittel bei 0,14, nach 12M ergab sich ein etwas höherer Mittelwert (0,18). Die Osteoklastenaktivität war nach 14M mit einer mittleren STS/TTS von 0,17 minimal niedriger als nach einer Standzeit von 12 Monaten.

Die Ergebnisse der Diätgruppe nach 1M waren relativ homogen, sodass gemittelt eine STS/TTS von 0,16 errechnet wurde. Ein leichter Anstieg der Osteoklastenaktivität war bis zum Zeitpunkt 3M zu verzeichnen (STS/TTS=0,18), diese stieg bis zu einer Standzeit von 12M weiter, sodass sich ein Mittelwert von 0,23 ergab. Die gefärbte pro Gesamttrabekeloberfläche lag bei der Diätgruppe mit 0,21 nach 14 Monaten etwas niedriger als nach einer Standzeit von 12 Monaten (Abb. 21).

Bei OVX+S ergab sich nach einem Monat Standzeit eine STS/TTS von 0,10. Zum TP=3M waren 15,1% der Trabekeloberfläche TRAP-positiv und auch bei der Pilotgruppe OVX+MP waren im Mittel 14,1% gefärbt. Ein signifikanter Anstieg der Osteoklastenaktivität war von 3M zu 12M zu verzeichnen ( $p=0,030$ ), wie in Abbildung 21 dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt lag die STS/TTS im Mittel bei 0,24.



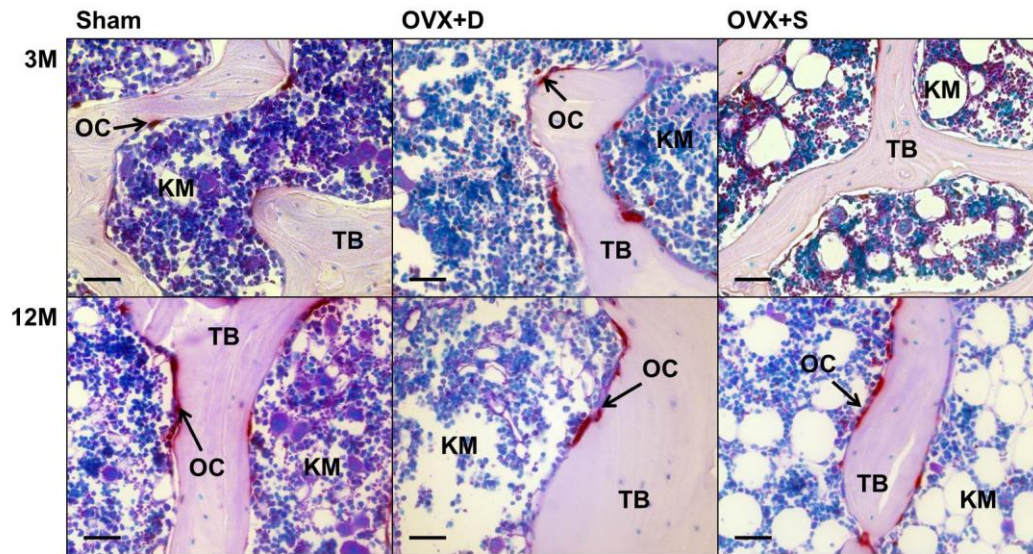
**Abbildung 21: Quantitative Auswertung der enzymhistochemisch ermittelten Osteoklastenaktivität.** Es zeigte sich zu allen Zeitpunkten eine höhere STS/TTS bzw. Osteoklastenaktivität bei OVX+D und OVX+S im Vergleich zur Sham-Gruppe bei tendenziell Aktivitätsanstieg mit Zunahme der Standzeit. Signifikanter Anstieg der Osteoklastenaktivität bei OVX+S von 3M auf 12M (STS/TTS=gefärbte/Gesamttrabekeloberfläche, TP=Standzeit, \*=  $p \leq 0,05$ , Games-Howell,  $n=6$  pro Zeitpunkt/Gruppe).

### **Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten**

Nach einem Monat Standzeit zeigte sich die höchste Osteoklastenaktivität bei OVX+D, während die STS/TTS der Sham- und Steroidgruppe relativ nahe beieinander lagen. Eine vergleichbare Konstellation konnte auch nach 3M bei insgesamt etwas gestiegener Osteoklastenaktivität beobachtet werden (Abb. 22). Zwischen der mit Dexamethason behandelten Gruppe und der Pilotgruppe gab es keine deutlichen Unterschiede in der Osteoklastenaktivität.

Nach 12M war die gefärbte pro Gesamttrabekeloberfläche bei OVX+D und OVX+S relativ ähnlich und jeweils höher als bei der Sham-Gruppe. Auch nach einer Standzeit

von 14M lag die STS/TTS bei OVX+D höher als bei der Sham-Gruppe. Insgesamt stieg die Osteoklastenaktivität mit zunehmender Standzeit tendenziell an.



**Abbildung 22: Enzymhistochemische Darstellung der Osteoklastenaktivität.**

Mit Hilfe der TRAP-Färbung lässt sich die Osteoklastenaktivität darstellen. In der Sham-Gruppe war die Osteoklastenaktivität im Vergleich zu 3M nach 12M bei geringerer Trabekeloberfläche erhöht. Auch bei OVX+D zeigten sich nach 12M eine erhöhte Osteoklastenaktivität und verminderte Trabekeloberfläche bei weniger, plump erscheinenden Trabekeln. Erhöhte Osteoklastenaktivität, deutlich mehr Fettvakuolen im KM und geringere trabekuläre Oberfläche durch weniger, dünne, kaum vernetzte Trabekel bei OVX+S nach 12M im Vergleich zu 3M. Zu allen Zeitpunkten höhere Osteoklastenaktivität und geringere Gesamttrabekeloberfläche bei OVX+D und OVX+S im Vergleich zur Sham-Gruppe (KM=Knochenmark, OC=Osteoklast, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=40µm).

Mit Hilfe der Enzymhistochemie konnten Unterschiede in der Osteoblasten- und der Osteoklastenaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe durch die verschiedenen Behandlungen festgestellt werden.

Die Osteoblastenaktivität bei OVX+D war nach einer Standzeit von 3 Monaten signifikant höher als bei der Sham-Gruppe und OVX+S, mit zunehmender Standzeit nahm sie weiter ab (12M). Anschließend konnte jedoch ein erneuter Anstieg der Osteoblastenaktivität beobachtet werden (Abb. 19), was ein Hinweis auf eine möglicherweise induzierte Osteomalazie sein könnte. Im Verlauf von 3M zu 12M nahm die Osteoblastenaktivität bei OVX+S signifikant zu. Zu allen Zeitpunkten konnte eine erhöhte Osteoklastenaktivität bei OVX+D im Vergleich zur Sham-Gruppe gezeigt werden, die mit Zunahme der Standzeit ebenfalls geringfügig anstieg, jedoch nie signifikant erhöht war (Abb. 21). Auch bei OVX+S nahm die Osteoklastenaktivität mit fortgeschrittener Standzeit zu.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die Multidefizienzdiät als auch die Steroidbehandlung zu einer erhöhten Osteoblastenaktivität, jedoch nach unterschiedlichen Standzeiten, führen können. Weiterhin scheint es durch diese



Behandlungen zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität sowie zur Abnahme der Trabekeloberfläche zu kommen.

Um die Auswirkungen der zellulären Imbalance auf den Knochenmetabolismus zu untersuchen, wurden knochenanabole sowie -katabole EZM-Proteine mit Hilfe von Immunhistochemie (IHC) analysiert.

Bei der deskriptiven Auswertung der IHC wurde neben der Anfärbbarkeit des Gewebes auch auf die Struktur und Beschaffenheit der Kortikalis, Spongiosa und des Knochenmarks geachtet. Da diese Ergebnisse jedoch schon bei der deskriptiven Analyse der Toluidinblau-Färbung (siehe Kapitel 4.1) beschrieben wurden, wird an dieser Stelle das Hauptaugenmerk auf die durch die Färbungen markierten Antigene und deren Lokalisation gelegt.

### **4.3 Veränderter Knochenanabolismus durch Langzeitdiät**

#### **4.3.1 Biglycan**

Biglycan ist ein kleines leucinreiches Proteoglykan, das eine Rolle bei der Kollagenfibrillogenese spielt.

In der Kontrollgruppe konnte Biglycan vor allem an der Trabekeloberfläche sowie perizellulär der Osteozyten nachgewiesen werden, es zeigten sich jedoch auch in der EZM gefärbte Bereiche. Auch die Oberfläche der Kortikalis sowie die Knochenmatrix unmittelbar um die kortikalen Osteozyten zeigten eine deutliche Farbreaktion. Einige Zellen des Knochenmarks, insbesondere die Megakaryozyten, waren auch gefärbt.

Im Vergleich zu den anderen Gruppen mit einer Standzeit von 3 Monaten, zeigte die Kontrollgruppe zum TP=0 eine deutlich größere, gefärbte Trabekelfläche (STA=stained trabecular area) pro Gesamttrabekelfläche (TTA=total trabecular area).

Bei der Sham-Gruppe waren nach einem Monat Standzeit ebenfalls die Knochenoberfläche und die EZM perizellulär gefärbt sowie stellenweise weitere Areale der EZM. Nach drei Monaten konnte Biglycan ebenfalls an vielen, weiteren Stellen nachgewiesen werden: an der Trabekeloberfläche, in der unmittelbaren Umgebung der Osteozyten und relativ häufig auch in anderen Bereichen der EZM sowie im Knochenmark wie in Abbildung 24 erkennbar. Die STA/TTA lag bei 0,051.

Nach 12 Monaten Standzeit fiel die Färbung mit Anti-Biglycan bei der Sham-Gruppe flächenmäßig relativ gering aus (0,028). Gefärbte Bereiche waren überwiegend an der Trabekeloberfläche und perizellulär der Osteozyten, seltener in der EZM und im Knochenmark zu finden.

Zum TP=14M zeigte die Sham-Gruppe einen etwas größeren Anteil Biglycan-positiver Areale ( $STA/TTA=0,043$ ) als nach 12 Monaten. Neben Färbungen an der Trabekeloberfläche und perizellulär konnte man hier auch einige in der EZM erkennen. Insgesamt lag bei der Sham-Gruppe die  $STA/TTA$  immer relativ niedrig mit einem Minimum bei 12M.

Die Tiere der Gruppe OVX+D zeigten nach einem Monat Standzeit gefärbte Bereiche an der Knochenoberfläche, perizellulär und in umschriebenen Bereichen der EZM.

Prinzipiell waren alle bisher genannten Lokalisationen vereinzelt auch nach 3M gefärbt, dennoch konnte Biglycan hier überwiegend an der Trabekeloberfläche sowie in den daran angrenzenden Bereichen nachgewiesen werden (Abb. 24). Nach der Standzeit von 3 Monaten war die  $STA/TTA$  mit 0,056 bei der Gruppe OVX+D am höchsten, gefolgt von der Sham-Gruppe.

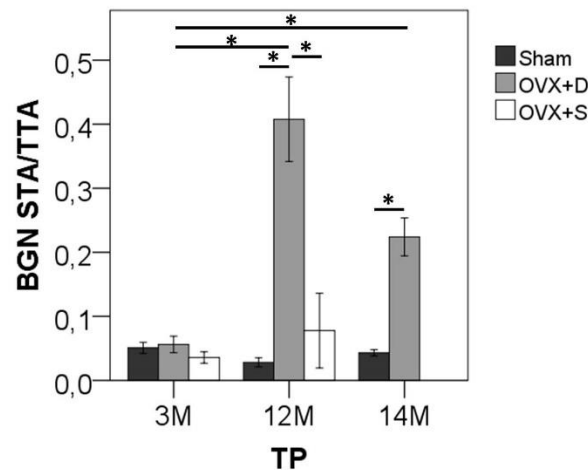
Von 3M zu 12M war ein signifikanter Anstieg der  $STA/TTA$  ( $p=0,010$ ) zu verzeichnen, wie in Abbildung 23 ersichtlich. Nach 12M zeigte die Gruppe OVX+D einen sehr großen Anteil gefärbter Trabekelfläche pro Gesamttrabekelfläche (0,408). So nahmen die gefärbten Areale stellenweise einen großen Teil der Trabekelfläche ein. Insgesamt konnte Biglycan in erster Linie an der Trabekeloberfläche nachgewiesen werden, von dort breitete sich die Färbung dann auf die Trabekel aus (Abb. 24).

Nach 14 Monaten zeigte die Diätgruppe mit einer  $STA/TTA$  von 0,224 eine flächenmäßig zwar geringere Farbreaktion als nach 12 Monaten, jedoch waren hier immer noch große Bereiche der Trabekelfläche gefärbt mit Betonung der oberflächennahen Areale. Der Anstieg der gefärbten pro Gesamttrabekelfläche von 3M auf 14M war bei OVX+D signifikant ( $p=0,006$ , Abb. 23).

Die Gruppe OVX+S zeigte nach einem Monat Standzeit eine sehr verhaltene Farbreaktion – sowohl von der Intensität als auch von der gefärbten Fläche her ( $STA/TTA=0,004$ ). Auffallend waren zudem die vielen Fettvakuolen bei OVX+S im Vergleich zu OVX+D und vor allem im Vergleich zur Sham-Gruppe.

Nach 3M konnte bei den steroidbehandelten Tieren Biglycan an der Trabekeloberfläche, perizellulär sowie an einigen Stellen in der Knochenmatrix gezeigt werden (Abb. 24), jedoch war die Farbreaktion flächenmäßig (0,036  $STA/TTA$ ) im Vergleich zur Sham-Gruppe abgeschwächt. Noch weniger gefärbte Bereiche pro Gesamttrabekelfläche (0,017) konnten bei der Pilotgruppe OVX+Methylprednisolon (OVX+MP) dargestellt werden, da teilweise auch gar keine Färbung der Paraffinschnitte zu verzeichnen war.

Nach einer Standzeit von 12 Monaten zeigten sich vor allem an der Trabekeloberfläche Biglycan-positive Bereiche, aber auch perizellulär und teilweise auch in umschriebenen Bereichen der EZM. Insgesamt ergab dies eine  $STA/TTA$  von 0,078.



**Abbildung 23: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Biglycan.**

Bei der Sham-Gruppe durchweg niedrige Werte für STA/TTA, dahingegen signifikanter Anstieg der STA/TTA bei OVX+D von 3M auf 12M und von 3M auf 14M. Etwas höherer Anteil gefärbter Trabekelfläche bei OVX+S nach 12M als nach 3M. Zum Zeitpunkt 12 Monate signifikant erhöhte STA/TTA bei OVX+D im Vergleich zu Sham und OVX+S (STA/TTA=gefärbte/Gesamttrabekelfläche, TP=Standzeit,  $*=p \leq 0.05$ , Games-Howell bzw. zum TP=14M Mann-Whitney-U,  $n=6$  pro Zeitpunkt/Gruppe).

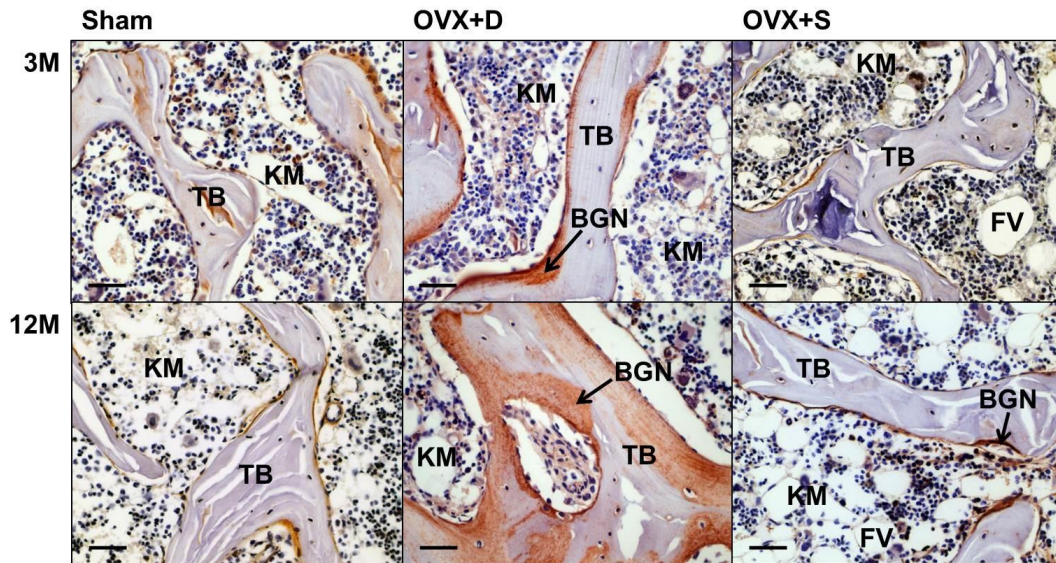
### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Nach einer Standzeit von einem Monat zeigte sich bei OVX+S die schwächste Farbreaktion. Die Sham-Gruppe und OVX+D zeigten ein ähnliches Färbemuster, allerdings waren bei OVX+D tendenziell mehr Areale in der EZM gefärbt.

Nach 3M war die STA/TTA bei OVX+D am höchsten, gefolgt von der Sham-Gruppe. Den geringsten Anteil gefärbter Trabekelfläche fand man bei den steroidbehandelten Tieren (Abb. 24).

Mit Abstand den größten Anteil gefärbter pro Gesamttrabekelfläche zeigte im Mittel die Gruppe OVX+D nach einer Standzeit von 12M. Zu diesem Zeitpunkt war die STA/TTA in dieser Gruppe signifikant höher als bei Sham oder OVX+S. Bei OVX+S fand man den zweithöchsten Mittelwert für STA/TTA zu diesem Zeitpunkt, allerdings waren die Ergebnisse innerhalb dieser Gruppe etwas heterogen. Die Färbung der Sham-Gruppe fiel verhältnismäßig schwächer aus.

Nach 14M war die STA/TTA der Diätgruppe im Mittel zwar etwas geringer als nach 12M, jedoch immer noch deutlich höher als bei der Sham-Gruppe.



**Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung mit Anti-Biglycan.**

Biglycan ist ein osteoanaboles Protein, das eine Rolle bei der Kollagenfibrillogenese spielt. Geringerer Anteil Biglycan(BGN)-positiver Trabekelfläche bei Sham nach 12M im Vergleich zu 3M, dahingegen nach 12M signifikant höherer Anteil gefärbter Trabekelfläche bei OVX+D als nach 3M. Auch bei OVX+S nach 12M etwas höherer Anteil gefärbter pro Gesamttrabekelfläche. Nach 12M Standzeit deutlich erhöhter Anteil BGN-positiver Trabekelfläche bei OVX+D im Vergleich zu den anderen Gruppen (BGN=Biglycan, FV=Fettvakuole, KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, Abbildungsmaßstab=40µm).

#### 4.3.2 Fibronectin

Fibronectin ist ein Matrixglykoprotein, das die Adhäsion von Zellen an Matrixkomponenten ermöglicht und eine Rolle bei der Differenzierung von Osteoblasten spielt.

Bei der Kontrollgruppe konnte Fibronectin ubiquitär nachgewiesen werden. Hier zeigten sich sowohl im kortikalen als auch im spongiösen Knochen gefärbte Bereiche in der EZM. Eine deutliche Färbung war an der Knochenoberfläche sowie in unmittelbarer Umgebung vieler Osteozyten zu beobachten. Einige Zellen des Knochenmarks waren ebenfalls gefärbt.

Die Sham-Gruppe zeigte nach 3 Monaten trabekulär und kortikal vereinzelte, gefärbte Bereiche der EZM, hauptsächlich jedoch eine Färbung der Knochenoberfläche und der Bereiche direkt um viele Osteozyten herum (Abb. 25).

Nach 12 Monaten konnte Fibronectin bei der Sham-Gruppe wieder deutlich an der Knochenoberfläche sowie in den Bereichen direkt um die Osteozyten herum gezeigt werden. Zudem sah man teilweise in der Knochenmatrix gefärbte Areale, in denen sich auch Knochenzellen befanden.

Nach 14 Monaten ähnelte das Färbemuster der Sham-Gruppe dem nach 12 Monaten, wobei hier weniger gefärbte Bereiche um Osteozyten und in der Knochenmatrix zu

verzeichnen waren. Die Färbung beschränkte sich überwiegend auf die Kortikalis- und Trabekeloberfläche sowie auf größere Bereiche des Knochenmarks.

Die Färbung in der Diätgruppe nach 3M ähnelte der der Sham-Gruppe, wirkte insgesamt jedoch dezenter (Abb. 25). Bei genauer Betrachtung fiel außerdem auf, dass seltener der Bereich um die Osteozyten gefärbt war, meist jedoch die Knochenoberflächen und kleine daran angrenzende Bereiche des Knochens.

Nach 12 Monaten konnte in OVX+D Fibronectin großflächig trabekulär nachgewiesen werden. Teilweise war fast die komplette Trabekelfläche gefärbt, teilweise nur die Trabekeloberfläche und größere, überwiegend oberflächennahe Bereiche (Abb. 25). Auch in der Kortikalis zeigten sich gefärbte Areale, wobei diese im Vergleich zur Spongiosa deutlich kleiner ausfielen und ein Großteil ungefärbt blieb. Die bindegewebig aussehenden Bereiche zwischen den bzw. um die Trabekel waren ebenfalls gefärbt.

Nach einer Standzeit von 14M konnte Fibronectin an den gleichen Stellen wie nach 12M nachgewiesen werden, es zeigte sich ein vergleichbares Färbemuster.

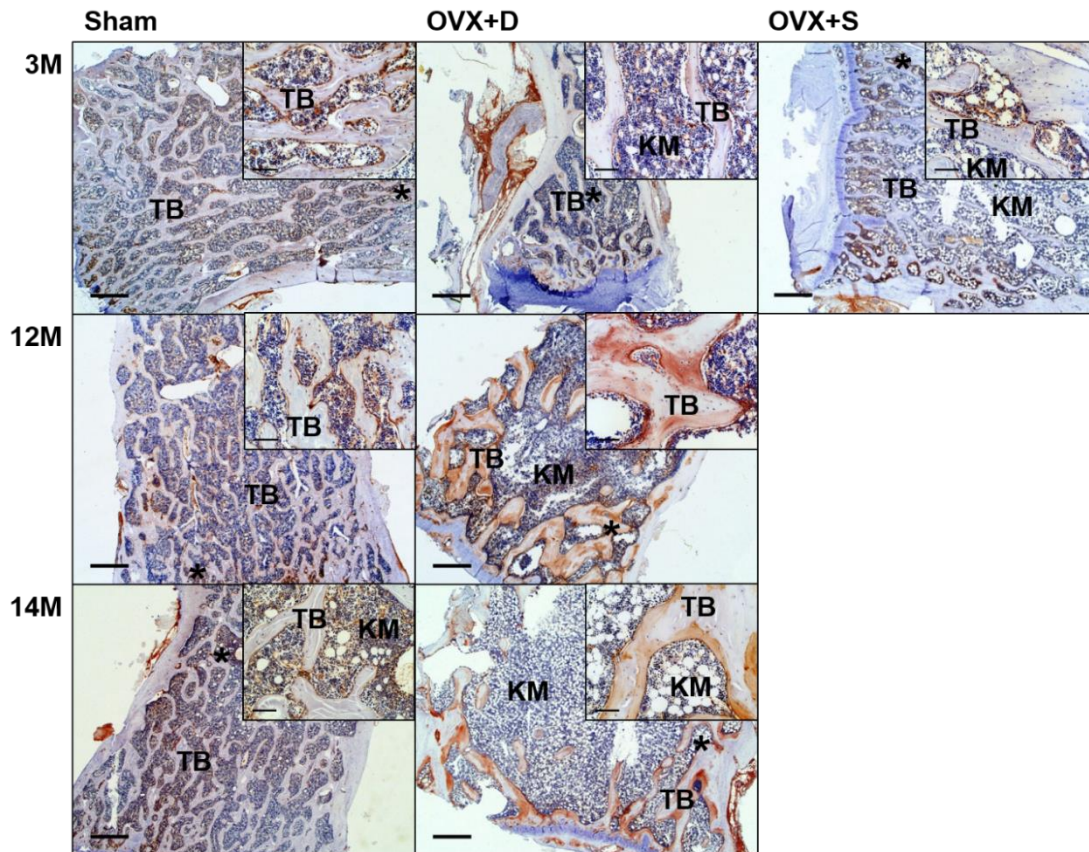
Bei der Steroidgruppe konnte nach einer Standzeit von 3M insgesamt in allen Bereichen des Knochens eine Farbreaktion gezeigt werden, allerdings war im Vergleich zu den anderen Gruppen eine geringere Fläche gefärbt. Überwiegend konnte an der Kortikalis- und Trabekeloberfläche Fibronectin nachgewiesen werden.

### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Zum Zeitpunkt 3M wirkte die Färbung der Sham-Gruppe am stärksten, gefolgt von der Diätgruppe, mit jedoch teilweise veränderter Lokalisation. Am wenigsten stark war die Farbreaktion bei OVX+S.

Nach 12M Standzeit konnte Fibronectin bei OVX+D im Vergleich zur Sham-Gruppe viel großflächiger nachgewiesen werden, teilweise war fast die komplette Trabekelfläche gefärbt (Abb. 25).

Das Färbemuster zum Zeitpunkt 14M ähnelte sowohl bei der Sham-Gruppe als auch bei OVX+D dem nach 12M, wobei bei der Sham-Gruppe die gefärbten Bereiche überwiegend an der Knochenoberfläche und seltener in der EZM zu finden waren.



**Abbildung 25: IHC mit Anti-Fibronectin.**

Fibronectin (FBN) ist ein Ankerprotein, das eine Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung spielt. Nach 3M stärkste Färbung bei der Sham-Gruppe, schwächste Farbreaktion bei OVX+S. Nach 12M und 14M jedoch deutlich größerer Anteil FBN-positiver Trabekelfläche bei OVX+D im Vergleich zur Sham-Gruppe sowie veränderte Lokalisation. Bei der Sham-Gruppe überwiegend positive Farbreaktion an der Knochenoberfläche, bei OVX+D auch ausgedehnt in der trabekulären EZM (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

#### 4.3.3 Osteocalcin

Osteocalcin gehört zur extrazellulären, nicht kollagenen Knochenmatrix, wird von Osteoblasten gebildet und gilt als Marker des Knochenaufbaus.

Die mit Anti-Osteocalcin gefärbten Paraffinschnitte der Kontrollgruppe sahen in der Übersicht nicht allzu stark gefärbt aus. Bei näherem Betrachten fielen jedoch die vielen gefärbten Bereiche an der Oberfläche der Kortikalis und der Trabekel, in der unmittelbaren Umgebung von Osteozyten sowie größere gefärbte Areale in der EZM, die Osteozyten einschlossen, auf. Auch im Knochenmark konnte eine Farbreaktion verzeichnet werden.

In der Sham-Gruppe konnte Osteocalcin nach 3M auch an allen bei der Kontrollgruppe genannten Lokalisationen nachgewiesen werden, allerdings befanden sich die gefärbten Bereiche überwiegend an der Knochenoberfläche sowie in umschriebenen, oft mittig gelegenen Knochenmatrixarealen.



Nach 12 Monaten konnte Osteocalcin insbesondere an der trabekulären und kortikalen Oberfläche, seltener auch direkt um Osteozyten herum sowie in umschriebenen Arealen in der Knochenmatrix nachgewiesen werden.

Nach 14 Monaten zeigte sich Osteocalcin bei der Sham-Gruppe in ähnlichen Lokalisationen wie nach 12 Monaten, allerdings kaum in der EZM und teilweise war die Färbung der Trabekeloberfläche auch sehr schwach.

Bei der Gruppe OVX+D zeigte sich die Färbung nach einer Standzeit von 3M überwiegend an der Knochenoberfläche, jedoch zusätzlich auch häufig in den danebenliegenden EZM-Bereichen der Trabekel und der Kortikalis und selten in der unmittelbaren Osteozytenumgebung. Teilweise zeigten auch einige der Zellen und andere Bestandteile des Knochenmarks eine Färbung.

Nach 12 Monaten war die Färbung deutlich intensiver als nach 3M (Abb. 26). Hier zeigte sich eine großflächige, intensive Farbreaktion des Trabekelwerks, die sich von der Trabekeloberfläche bis teilweise über nahezu den ganzen Trabekel erstreckte. Auch die inneren kortikalen Schichten sowie die bindegewebig aussehenden Bezirke um die Trabekel waren gefärbt.

Obwohl nach 12 Monaten eine intensive Farbreaktion im Trabekelwerk der OVX+D zu verzeichnen war, zeigten die Trabekel und die Kortikalis nach 14 Monaten kaum eine Farbreaktion. Lediglich an einigen Stellen war die Trabekeloberfläche schwach gefärbt und an sehr wenigen Stellen die Umgebung der Osteozyten oder kleine Bereiche der EZM (Abb. 26). Die bindegewebigen Areale hingegen zeigten sich überwiegend gefärbt.

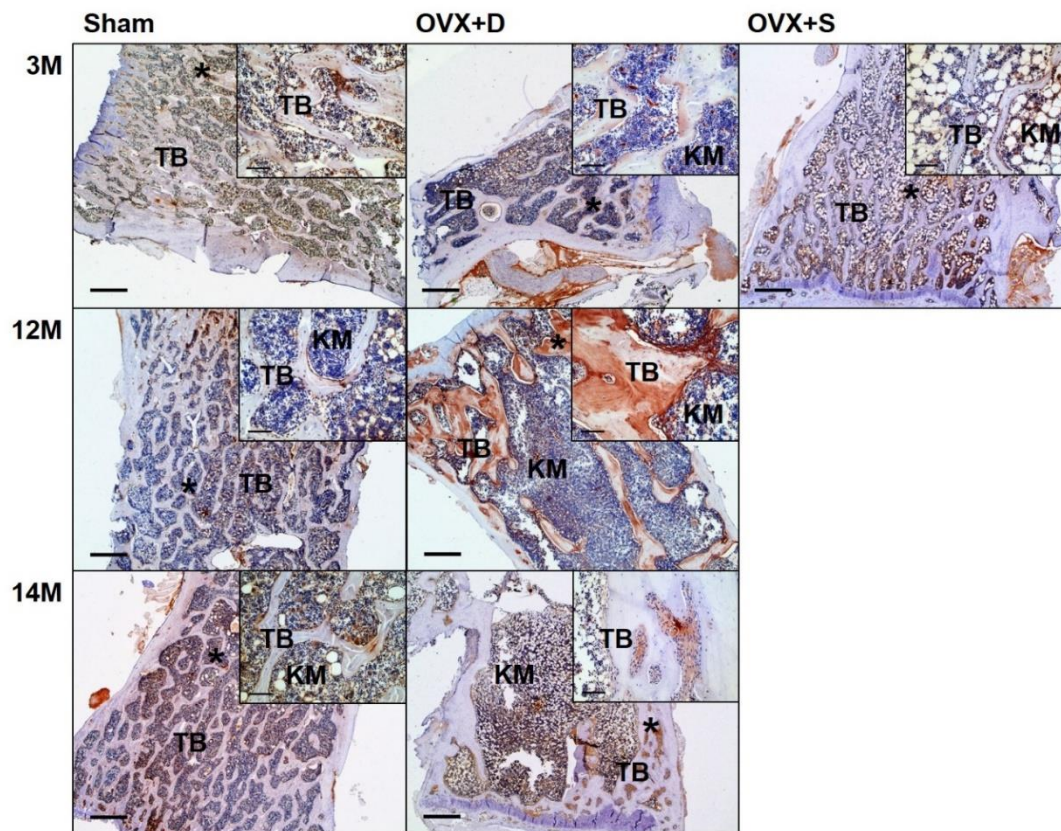
Bei der Steroidgruppe konnte Osteocalcin nach 3M überwiegend an der Oberfläche des spongiösen und teilweise auch des kortikalen Knochens nachgewiesen werden, vereinzelt auch um einige Knochenzellen herum sowie in der EZM.

#### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Nach einer Standzeit von 3 Monaten zeigte sich bei der Sham-Gruppe und OVX+D eine deutliche Farbreaktion, allerdings befand sich hier Osteocalcin teilweise an unterschiedlichen Stellen des Trabekelwerks. Bei der Sham-Gruppe war es überwiegend an der Knochenoberfläche und mittig in der EZM, bei der Diätgruppe in oberflächennahen Bereichen gelegen. Die Steroidgruppe zeigte eine vergleichsweise dezentere Farbreaktion.

Zum Zeitpunkt 12M war die Farbreaktion bei OVX+D im Vergleich zur Sham-Gruppe stärker, wie auf Abbildung 26 ersichtlich. Bei OVX+D war die Trabekeloberfläche sowie teilweise annähernd der ganze Trabekel gefärbt.

Während die Farbreaktion in der Sham-Gruppe nach 14M der nach 12M ähnlich war, nur ein wenig schwächer, konnte zu diesem Zeitpunkt kaum Osteocalcin im kortikalen und spongiösen Knochen der Diätgruppe nachgewiesen werden.



**Abbildung 26: IHC mit Anti-Osteocalcin.**

Osteocalcin (OCN) wird von Osteoblasten gebildet, ist Teil der extrazellulären, nicht-kollagenen EZM und Marker des Knochenaufbaus. Bei der IHC mit Anti-OCN zeigte sich eine deutliche Farbreaktion nach 3M, bei Sham überwiegend an der Knochenoberfläche und mittig in der EZM, bei der Diätgruppe oberflächennah. Färbung der Steroidgruppe dezenter. Nach 12M ausgeprägtere Färbung bei OVX+D mit Färbung der Trabekeloberfläche sowie partiell eines Großteils des Trabekels, allerdings nach 14M kaum OCN nachweisbar bei OVX+D (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

#### 4.3.4 Tenascin C

Tenascin C (TNC) ist ein Glykoprotein, das von Osteoblasten gebildet wird und wichtig ist für das Wachstum und die Differenzierung von Osteoblasten.

Bei der Kontrollgruppe konnte Tenascin C sowohl trabekulär als auch kortikal überwiegend direkt um die Osteozyten herum und in extrazellulären Bereichen, die Osteozyten einschlossen, nachgewiesen werden. Selten zeigte sich auch die trabekuläre oder kortikale Knochenoberfläche gefärbt. Die Färbung war kortikal betont. Im Knochenmark zeigte sich zu keinem Zeitpunkt und bei keiner Gruppe eine Farbreaktion.



Die immunhistochemische Färbung der Sham-Gruppe mit Anti-Tenascin C nach 3 Monaten Standzeit ähnelte weitgehend der der Kontrollgruppe, allerdings zeigte sich viel häufiger eine ausgedehntere Färbung der Trabekeloberfläche sowie der kortikalen Oberfläche, besonders zur Wirbelkörperaußenseite hin.

Nach 12M war eine deutliche Farbreaktion der Kortikalis zu beobachten: Hier war oft der Bereich um die Osteozyten gefärbt, häufig auch etwas großflächiger, sowie die äußere Kortikalisoberfläche. Trabekulär zeigten sich ebenfalls gefärbte Bereiche direkt um die Osteozyten und an der Trabekeloberfläche, allerdings kaum in der Knochenmatrix.

Nach 14 Monaten Standzeit konnte Tenascin C bei der Sham-Gruppe an sehr ähnlichen Stellen nachgewiesen werden wie nach 12 Monaten. In der Kortikalis zeigten sich die Färbungen jedoch eher unmittelbar um die Osteozyten und kaum in der EZM.

Bei der Gruppe OVX+D zeigte sich nach 3M eine kortikal betonte Farbreaktion, die jedoch im Vergleich zu der der Sham-Gruppe verhalten wirkte (Abb. 27). Nur an wenigen Stellen war die EZM, die direkte Osteozytenumgebung oder die Oberfläche des Trabekelwerks gefärbt. Kortikal war eine Färbung häufiger in der unmittelbaren Umgebung der Osteozyten, der EZM sowie teilweise der äußeren Kortikalisoberfläche zu finden.

Nach 12M konnte man vermehrt gefärbte Areale in der trabekulären EZM erkennen. Daneben zeigten sich auch Färbungen um die Osteozyten herum sowie an der Trabekel- bzw. äußeren Kortikalisoberfläche.

Nach 14M lagen die gefärbten Bereiche bei OVX+D diffus in der trabekulären EZM und in den bindegewebigen Arealen intertrabekulär verteilt. Teilweise sah man zusätzlich eine sehr deutliche Färbung der Trabekeloberfläche, teilweise wirkte die Farbreaktion eher verhalten.

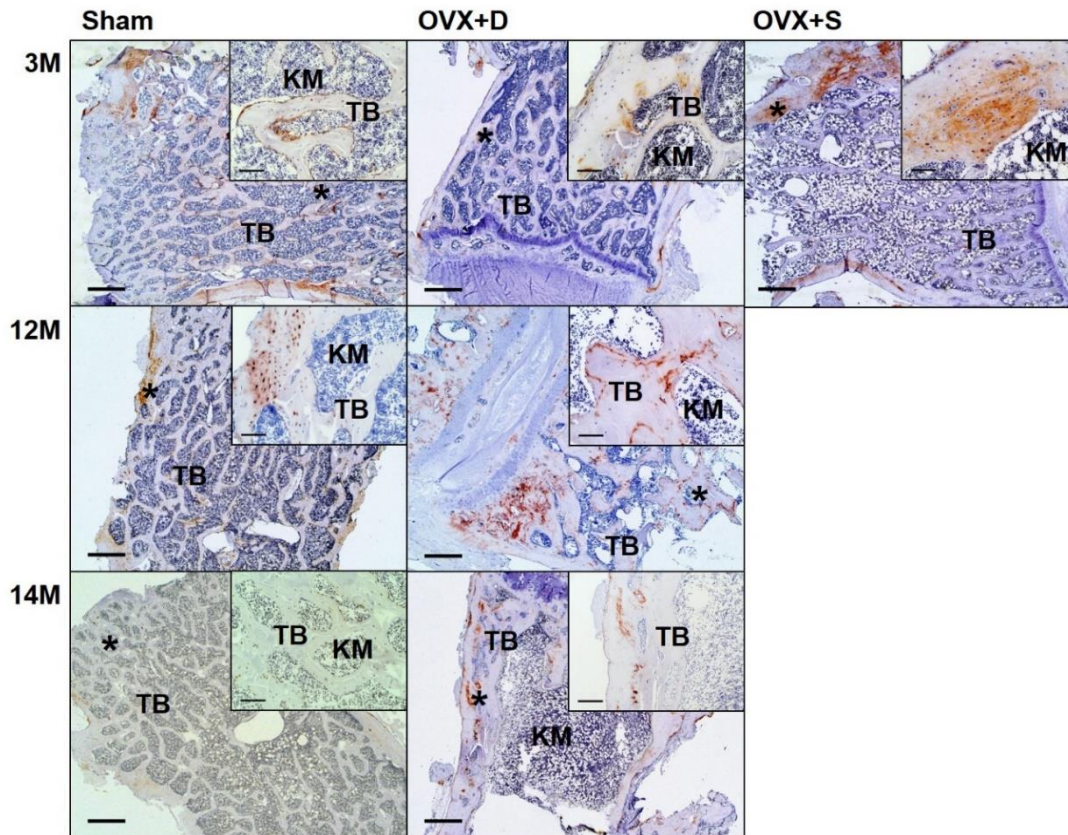
Die Tiere der Gruppe OVX+S zeigten zum Zeitpunkt 3M weniger gefärbte Bereiche als die Diätgruppe. Diese lagen häufiger kortikal und waren teilweise unmittelbar, teilweise großflächiger in der Knochenmatrix um Osteozyten herum gelegen (Abb. 27). Die Knochenoberflächen waren ungefärbt.

### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Nach einer Standzeit von 3 Monaten war die ausgeprägteste Farbreaktion bei der Sham-Gruppe zu sehen, die der Diätgruppe wirkte im Vergleich dazu deutlich verhaltener und bei der Steroidgruppe zeigten sich im Vergleich zu OVX+D weniger gefärbte Bereiche, jedoch teilweise großflächig (Abb. 27).

Zum Zeitpunkt 12M und 14M konnte Tenascin C bei der Sham-Gruppe vor allem um Osteozyten herum sowie an der Knochenoberfläche nachgewiesen werden.

Dahingegen lagen die gefärbten Areale bei der Diätgruppe vermehrt in der trabekulären EZM sowie in den bindegewebigen Bereichen intertrabekulär.



**Abbildung 27: IHC mit Anti-Tenascin C.**

Tenascin C (TNC) ist ein von Osteoblasten produziertes Glykoprotein, das eine Rolle beim Wachstum und der Differenzierung von Osteoblasten spielt. Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-TNC zeigte sich nach 3M die ausgeprägteste Farbreaktion bei der Sham-Gruppe mit gefärbten Bereichen überwiegend an der Knochenoberfläche. Nach 12M und 14M bei der Sham-Gruppe weiterhin TNC an der Knochenoberfläche sowie um Osteozyten herum nachweisbar, bei OVX+D eher extrazellulär sowie in den bindegewebigen Arealen intertrabekulär (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

#### 4.4 Geringfügiger Einfluss der Langzeitdiät auf den Knochenkatabolismus

##### 4.4.1 Carboanhydrase 2

Die Carboanhydrase 2 ist ein zytosolisches Enzym der Osteoklasten und trägt durch Protonenbereitstellung entscheidend zum Knochenabbau bei.

In der Kontrollgruppe konnte sowohl im kortikalen als auch im spongiösen Knochen in der EZM stellenweise Carboanhydrase 2 nachgewiesen werden, wobei die Färbung teilweise deutlich, teilweise eher dezent ausgeprägt war. Auch die Zellen des Knochenmarks sowie die wenigen Fettvakuolen zeigten eine positive Reaktion.

Nach drei Monaten Standzeit zeigte die immunhistochemische Färbung mit Anti-Carboanhydrase 2 in der Sham-Gruppe relativ großflächig positive Reaktionen. Sowohl

kortikal als auch trabekulär gab es deutliche, in der Intensität variierende Farbreaktionen, die sich trabekulär an der Trabekeloberfläche, in der EZM sowie in der unmittelbaren Osteozytenumgebung zeigten, kortikal eher an der Knochenoberfläche und in der Knochenmatrix (Abb. 28).

Nach 12M konnte eine in der Intensität schwankende, flächenmäßig relativ ausgedehnte Färbung der Trabekel dargestellt werden, wobei die intensiven Färbungen tendenziell mittig im Trabekelwerk zu finden waren, meistens um Knochenzellen herum angeordnet.

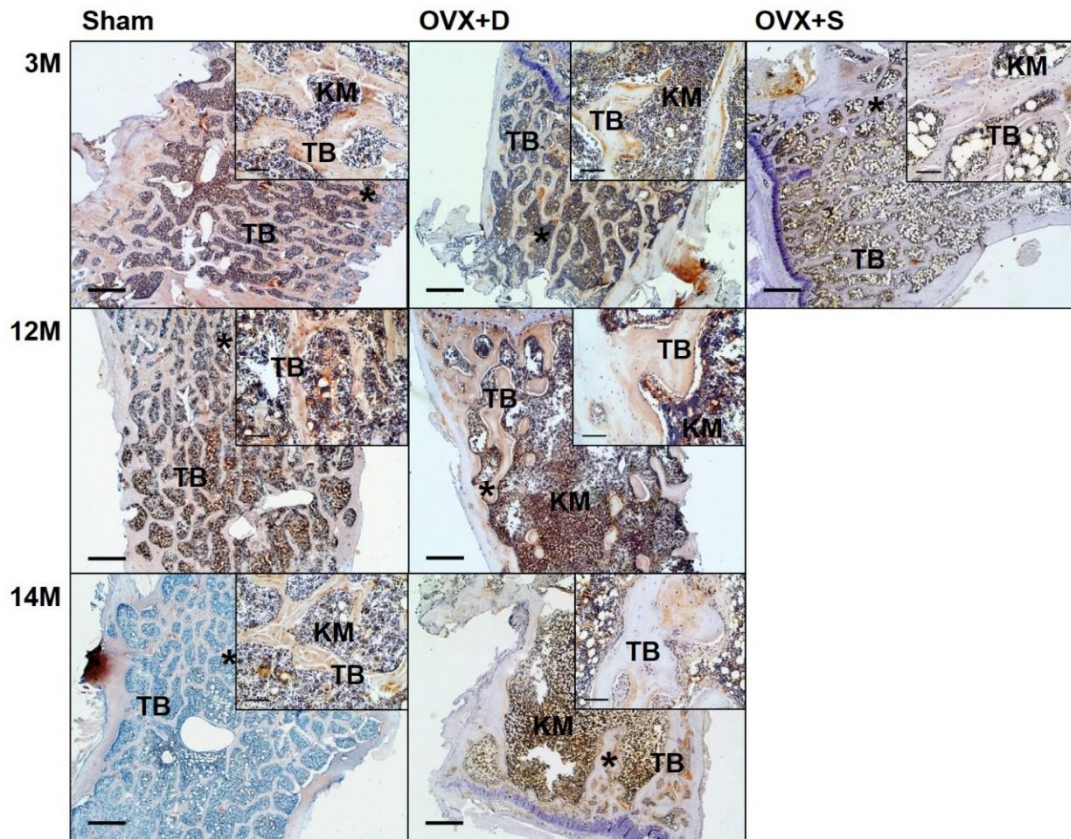
Nach einer Standzeit von 14M zeigten die relativ unruhig wirkenden Trabekel der Sham-Gruppe eine diffuse positive Reaktion auf Anti-Carboanhydrase 2, wobei alle Bereiche von der Trabekeloberfläche über die Knochenmatrix bis hin zur direkten Osteozytenumgebung vertreten waren. Die Kortikalis und das Knochenmark waren ebenfalls unregelmäßig gefärbt.

Bei OVX+D konnte nach 3M deutlich Carboanhydrase 2 nachgewiesen werden. Die Färbung fiel nicht so großflächig wie bei der Sham-Gruppe aus, allerdings waren einige umschriebene Bereiche sehr deutlich gefärbt. Diese Bereiche waren zum Großteil um Knochenzellen herum zu finden und zur Knochenoberfläche gerichtet (Abb. 28).

Auch nach 12 Monaten Standzeit zeigte sich eine relativ großflächige positive Färbereaktion, wobei die Carboanhydrase 2 hier z.T. in der Mitte der Trabekel, bei anderen Tieren vor allem im Bereich der Trabekeloberfläche nachgewiesen werden konnte. In der Kortikalis lagen die gefärbten Bereiche überwiegend in Richtung des Trabekelwerks und Knochenmarks. Die stark gefärbten Areale enthielten meist mehrere Osteozyten.

Zum Zeitpunkt 14M war bei der Diätgruppe die positive Farbreaktion diffus verteilt und zusätzlich im Knochenmark sowie in den bindegewebigen Flächen intertrabekulär zu finden. In der Kortikalis war die Carboanhydrase 2 eher in Richtung der Mitte des Wirbelkörpers nachzuweisen.

Bei den Tieren, die mit Steroiden behandelt wurden, konnte das Enzym nach 3M auch nachgewiesen werden, wobei hier die Färbung flächenmäßig etwas geringer ausfiel als bei der Diätgruppe. Die gefärbten Bereiche befanden sich seltener an der Knochenoberfläche, sondern viel eher in der Mitte der Trabekel bzw. Kortikalis, wo sie häufig Osteozyten einschlossen.



**Abbildung 28: IHC mit Anti-Carboanhydrase 2.**

Carboanhydrase 2 (CA2) ist ein zytosolisches Enzym der Osteoklasten und trägt zum Knochenabbau bei. Nach 3M diffuse großflächige Farbreaktion bei der Sham-Gruppe, bei OVX+D dahingegen intensivere, weniger ausgedehnte Färbung, geringste bei OVX+S. Nach 12M großflächige, wenig intensive Färbung bei beiden Gruppen, bei OVX+D etwas intensiver. Diffuser Nachweis von CA2 nach 14M bei beiden Gruppen (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Nach einer Standzeit von drei Monaten war die Färbung mit Anti-Carboanhydrase 2 bei der Sham-Gruppe großflächiger als bei der Diätgruppe, bei der die Färbung jedoch sehr intensiv und wiederum im Vergleich zu OVX+S flächenmäßig größer ausfiel (Abb. 28). Die gefärbten Bereiche waren teilweise auch verschieden lokalisiert. Die Zellen des Knochenmarks sowie die Fettvakuolen, die besonders in der Gruppe OVX+S zahlreich vorzufinden waren, waren auch häufig gefärbt.

Nach 12M war sowohl bei der Sham-Gruppe als auch bei OVX+D die Färbung relativ großflächig (Abb. 28), teilweise jedoch bei der Sham-Gruppe in der Intensität schwächer sowie innerhalb der Diätgruppe an verschiedenen Lokalisationen. Im Knochenmark zeigten zum Teil die Zellen, die Fettvakuolen sowie bei der Diät-Gruppe die partiell die Trabekel umgebenden, bindegewebig wirkenden Bereiche eine Färbung.

Nach 14M war bei beiden Gruppen eine diffuse positive Reaktion auf Anti-Carboanhydrase 2 zu verzeichnen.

#### 4.4.2 MMP-9

MMP-9 wird von Osteoklasten gebildet und wirkt entscheidend am Abbau der EZM mit.

Bei Färbung der Wirbelkörper der Kontrollgruppe mit Anti-MMP-9 konnte nahezu überall eine positive Farbreaktion verzeichnet werden, wobei die gefärbten Bereiche großflächig und diffus verteilt sowie in ihrer Intensität variierend waren. Die Färbung wurde meist nach kranial bzw. kaudal (in Richtung der Wachstumsfugen) etwas intensiver.

In der Sham-Gruppe konnte MMP-9 nach 3M ubiquitär nachgewiesen werden, insbesondere jedoch an der Trabekeloberfläche sowie in der Extrazellulärmatrix der Trabekel und der Kortikalis, dort wiederum vorwiegend in der z.T. auch unmittelbaren Umgebung von Knochenzellen (Abb. 29). Auch die Zellen des Knochenmarks zeigten eine deutliche Anfärbbarkeit. Die Färbeintensität nahm dabei in Richtung der Wachstumsfugen hin zu.

Nach 12M entsprach der Nachweis von MMP-9 weitgehend dem nach einer Standzeit von 3 Monaten. Wieder zeigte sich eine relativ großflächige positive Farbreaktion, häufig kranial bzw. kaudal am intensivsten sowie an der Trabekeloberfläche und in umschriebenen Bereichen in der Knochenmatrix.

Nach 14 Monaten ähnelte die immunhistochemische Färbung mit Anti-MMP-9 bei der Sham-Gruppe teilweise der nach 12 Monaten. Bei einigen Tieren zeigte sich jedoch eine flächenmäßig deutlich reduzierte, aber dennoch häufig intensive Farbreaktion. Hier konnte MMP-9 überwiegend an der Trabekeloberfläche sowie in eng umschriebenen Bereichen der EZM der Spongiosa dargestellt werden. Auch das Knochenmark zeigte eine Färbung bei allen Komponenten.

Bei der Diätgruppe konnte MMP-9 nach einer Standzeit von 3 Monaten an den verschiedensten Stellen nachgewiesen werden, bevorzugt jedoch an der Trabekeloberfläche, in der EZM und um Osteozyten herum.

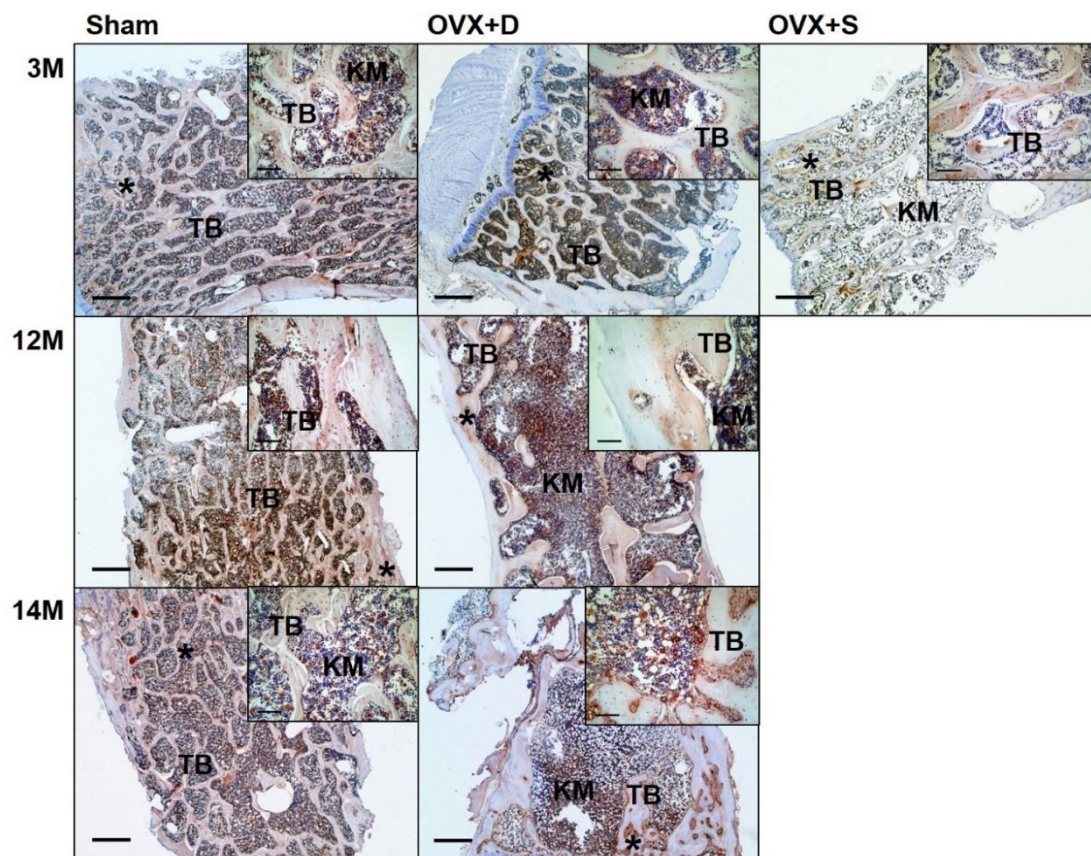
Nach 12M ließ sich MMP-9 bei der Diätgruppe großflächig trabekulär nachweisen (Abb. 29). Die Färbung wurde stellenweise intensiver in Richtung Trabekeloberfläche und an der Trabekeloberfläche selbst. Die Kortikalis zeigte nur nach innen hin gefärbte Bereiche. Die teilweise intertrabekulär bindegewebig wirkenden Stellen zeigten auch positive Farbreaktionen.

Zum Zeitpunkt 14M hatte die Diätgruppe teils ein sehr ausgedehnt gefärbtes Trabekelwerk mit sehr unterschiedlicher Färbeintensität, teils zeigte sich lediglich eine



im Bereich der Trabekeloberfläche gelegene Farbreaktion. MMP-9 konnte jeweils in den bindegewebig wirkenden Bereichen zwischen den Trabekeln sowie bei den Zellen des Knochenmarks dargestellt werden. Die Kortikalis war wieder fast nur in Richtung des Knochenmarks gefärbt.

Bei der Gruppe OVX+S konnte nach einer Standzeit von 3 Monaten MMP-9 in einem geringfügig kleineren Bereich als bei OVX+D nachgewiesen werden, jedoch in etwas veränderter Lokalisation: Bei beiden Gruppen lagen die gefärbten Bereiche zum größten Teil an der Trabekel- bzw. Knochenoberfläche und mittig in der Knochenmatrix der Trabekel. Jedoch waren bei OVX+D vorwiegend die oberflächennahen, bei OVX+S eher die zentralen Bereiche der Trabekel gefärbt (Abb. 29). Auffallend war hier wieder die große Zahl der Fettvakuolen bei den steroidbehandelten Tieren.



**Abbildung 29: IHC mit Anti-MMP-9.**

MMP-9 wird von Osteoklasten gebildet und spielt eine Rolle beim Knochenabbau. Nach 3M zeigte sich die deutlichste Farbreaktion bei der Sham-Gruppe, gefolgt von OVX+D, etwas weniger bei OVX+S. Nach 12M diffuse Färbung bei beiden Gruppen, minimal ausgedehnter und intensiver bei OVX+D. Nach 14M ähnliches Ergebnis, jedoch sehr heterogene Färbung bei OVX+D, minimal stärker als bei Sham (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

**Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten**

Nach einer Standzeit von 3 Monaten wirkte bei OVX+D der gefärbte Bereich, insbesondere der intensiv gefärbte, flächenmäßig geringer als bei der Sham-Gruppe. Bei OVX+S wirkte die gefärbte Fläche minimal kleiner als bei OVX+D, hier war diese jedoch auch anders lokalisiert.

Nach 12 Monaten zeigte sich bei beiden Gruppen eine überwiegend großflächige Farbreaktion (Abb. 29), wobei diese bei OVX+D tendenziell ein wenig ausgedehnter und intensiver wirkte.

Nach 14M ähnelte bei der Sham-Gruppe das Färbemuster dem nach 12M, dennoch war es trotz zum Teil intensiver Färbung flächenmäßig kleiner. Bei der Diätgruppe war die Farbreaktion sowohl auf die Fläche als auch auf die Intensität bezogen relativ heterogen, alles in allem teilweise minimal großflächiger und intensiver als bei der Sham-Gruppe.

**4.4.3 MMP-14**

MMP-14 ist eine membranständige Matrixmetalloproteinase der Osteoklasten, die im Bereich der Haftzone vorkommt und eine Rolle bei der Bildung von Knochenkanälchen spielt.

MMP-14 konnte bei der Kontrollgruppe sowohl in der kortikalen als auch in der spongiösen EZM nachgewiesen werden. Hierbei waren meist die Bereiche in der Kortikalis stärker gefärbt. Es konnte keine Färbung der Knochenoberfläche und nur teilweise der Region direkt um die Osteozyten festgestellt werden. Auffällig war die intensive Farbreaktion der Megakaryozyten und einiger anderer Zellen des Knochenmarks.

Bei der Sham-Gruppe befand sich nach drei Monaten Standzeit in der kortikalen und spongiösen EZM MMP-14 (Abb. 30). Die Färbung der Kortikalis wirkte jedoch auch hier häufig intensiver und beschränkte sich eher auf die nach innen gerichteten Bereiche, wobei an einigen Stellen auffiel, dass die innerste Schicht der Kortikalis ungefärbt blieb. Im Gegensatz zur Kontrollgruppe konnte hier auch eine deutliche Färbung der Trabekel- und Kortikalisoberfläche beobachtet werden. In den gefärbten Flächen waren häufig viele Osteozyten zu finden. Im Trabekelwerk konnte eine intensivere Farbreaktion in Richtung der Wachstumsfugen beobachtet werden.

Nach 12 Monaten Standzeit ähnelte die immunhistochemische Färbung der Sham-Gruppe sehr der nach 3 Monaten. Kleine auffallende Unterschiede waren die flächenmäßig ein wenig geringere Farbreaktion trabekulär sowie das Färbemuster kortikal. Hier zeigten sich teils bis in die äußeren Schichten gefärbte Bereiche.

Nach 14 Monaten konnte weiterhin in allen Lokalisationen MMP-14 nachgewiesen werden, wobei die Färbung an weniger Stellen, aber nicht weniger intensiv zu sehen war. Auch hier zeigte sich die Färbung kortikal betont.

Bei der Gruppe OVX+D konnte nach 3M MMP-14 ebenfalls in der kortikalen und spongiösen EZM nachgewiesen werden sowie an den Knochenoberflächen. Trabekulär war neben umschriebenen intratrabekulären Bereichen vor allem die Trabekeloberfläche deutlich MMP-14 positiv.

Nach 12M zeigte sich eine großflächige, eher schwache Färbung des massiven Trabekelwerks sowie der inneren Kortikalis mit vereinzelt intensiver gefärbten Bereichen, die sich überwiegend an der Trabekeloberfläche befanden (Abb. 30). Auch das bindegewebig wirkende Gewebe zwischen den Trabekeln zeigte eine positive Farbreaktion.

Nach 14 Monaten konnte MMP-14 in der Diätgruppe kortikal und trabekulär – jeweils in der EZM und an der Knochenoberfläche – nachgewiesen werden. Des Weiteren zeigten die bindegewebigen Bereiche, die hier auch teilweise in der Kortikalis zu finden waren, abermals eine Färbung. Am Auffälligsten waren jedoch die unruhig wirkende Knochenstruktur der wenigen verdickten Trabekel und die häufig vorkommende positive Farbreaktion der Trabekeloberfläche.

Auch in der Gruppe OVX+S konnte MMP-14 nach einer Standzeit von drei Monaten sowohl an der Knochenoberfläche als auch in der EZM und direkt um die Osteozyten herum nachgewiesen werden. Trabekulär war die Färbung eher in der EZM als an der Trabekeloberfläche lokalisiert. Es zeigte sich eine intensive Farbreaktion der inneren Kortikalisschichten sowie einiger Knochenmarkszellen (insbesondere der Megakaryozyten).

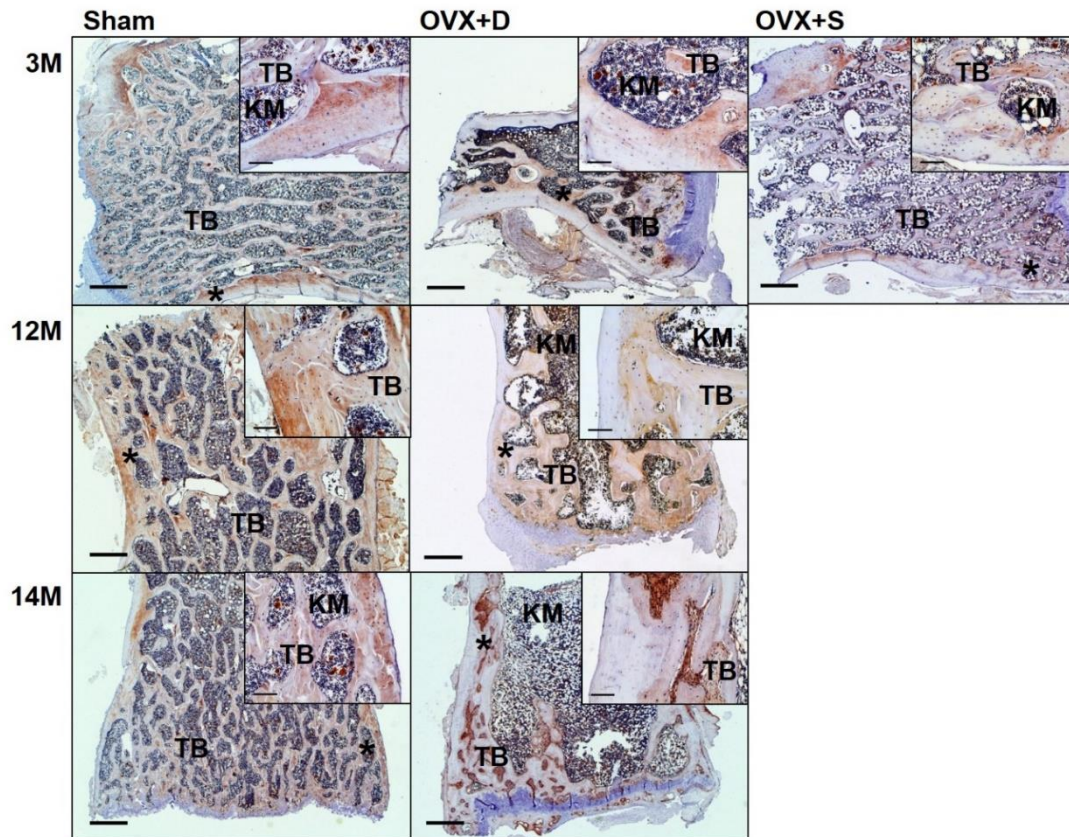
#### ***Unterschiede zwischen den Gruppen zu verschiedenen Standzeiten***

Nach drei Monaten Standzeit fiel die Farbreaktion bei OVX+D zwar flächenmäßig etwas kleiner aus als bei der Sham-Gruppe, jedoch nicht weniger intensiv. Bei OVX+D und OVX+S zeigte sich eine intensive Färbung der inneren Kortikalisschichten, die trabekuläre Färbung war jedoch bei den beiden Gruppen unterschiedlich lokalisiert: Bei OVX+D lagen die gefärbten Areale eher an der Trabekeloberfläche, bei OVX+S eher in der trabekulären EZM (Abb. 30).

Sowohl nach 12M als auch nach 14M zeigte sich bei der Sham-Gruppe und OVX+D ein diffuses Färbemuster mit gefärbten Arealen in allen bisher beschriebenen Lokalisationen. Nach 12M lag dies bei Sham eher kortikal betont, bei der Diätgruppe eher großflächig trabekulär. Zusammengenommen waren keine großen Unterschiede in der Färbeintensität oder der MMP-14 positiven Fläche zu erkennen, lediglich einige



wenige Unterschiede in der Lokalisation der Färbung zwischen den Gruppen waren festzustellen.



**Abbildung 30: IHC mit Anti-MMP-14.**

MMP-14 kommt membrangebunden auf Osteoklasten im Bereich der Haftzonen vor und spielt eine Rolle bei der Bildung der Knochenkanälchen. Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-MMP-14 zeigte sich nach 3M die flächenmäßig ausgedehnteste Färbung bei der Sham-Gruppe. Unterschiedliche Lokalisation der trabekulären Färbung: bei OVX+D überwiegend an der Trabekeloberfläche, bei OVX+S in der trabekulären EZM. Nach 12M und 14M sah man zwischen den beiden Gruppen keine großen Unterschiede in der Färbintensität, lediglich in der Lokalisation. Bei OVX+D nach 12M überwiegend trabekuläre Färbung, bei der Sham-Gruppe kortikal betont (KM=Knochenmark, TB=trabekulärer Knochen, \*=in den eingeschobenen Fotos vergrößert dargestellter Bereich, Abbildungsmaßstab größere Fotos=0.6mm, Abbildungsmaßstab kleinere eingeschobene Fotos=0.10mm).

Insgesamt zeigte sich überwiegend nach einer Standzeit von 12 Monaten ein unausgewogener Knochenumbau. Bei OVX+D konnte bei der immunhistochemischen Färbung knochenanaboler EZM-Proteine eine erhöhte Aktivität mit Zunahme der Standzeit sowie teilweise veränderte Lokalisationen im Vergleich zur Sham-Gruppe festgestellt werden. Dahingegen zeigte die immunhistochemische Färbung knochenkataboler EZM-Proteine kaum Aktivitätsunterschiede, weder zwischen den Gruppen noch zu verschiedenen Standzeiten.

Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf einen veränderten Knochenanabolismus mit Zunahme der Standzeit hin. Weiterhin erscheint eine Langzeitbehandlung mit Multidefizienzdiät oder Steroiden notwendig, um deutliche Veränderungen im Bereich der Knochenstruktur sowie im Hinblick auf den Knochenmetabolismus zu erzielen.

## 5. Diskussion

Die Osteoporose gewinnt immer mehr an Bedeutung in der westlichen Gesellschaft und doch weiß man noch verhältnismäßig wenig über die Pathogenese und vor allem über die Frakturheilung im systemisch erkrankten Knochen. In der Literatur sind bereits viele verschiedene Tiermodelle zur Untersuchung der unterschiedlichen Osteoporoseformen beschrieben, allerdings existiert bislang noch kein definitiv etabliertes, gesichertes und reproduzierbares Tiermodell für alle Erkrankungsformen (Kalu 1991; Rodgers et al. 1993).

Gezüchtete Laborratten wie beispielsweise die häufig genutzten Sprague Dawley Ratten, aber auch Wistar und Fischer 344 Ratten sind besonders geeignet als Kleintiermodelle für die Osteoporoseinduktion. Obwohl sie weder hormonell noch anatomisch mit dem menschlichen Organismus bzw. Knochen komplett übereinstimmen, können sie dennoch wertvolle Informationen über die Pathophysiologie der unterschiedlichen Osteoporoseformen und den Knochenmetabolismus im systemisch erkrankten Knochen liefern. So ist die ovariectomierte Ratte als Modell für die postmenopausale Osteoporose bereits erforscht und wird genutzt, um neue therapeutische Ansätze zu testen. Das Kleintiermodell Ratte dient häufig auch der Untersuchung und Beurteilung einer neuen Versuchsanordnung, bevor diese auf ein Großtiermodell übertragen wird. (Duque & Watanabe 2011; Turner 2001)

Allerdings ist auch bekannt, dass eine Ovariectomie (OVX) alleine zwar die mechanischen Eigenschaften des Knochens reduzieren kann, allerdings wird die Knochendichte nicht so weit abgesenkt, dass man dies mit der Knochendichtereduktion des osteoporotischen Knochens beim Menschen vergleichen könnte. Um einen signifikanten Knochenmassenverlust zu induzieren, sind daher zusätzliche diätetische, medikamentöse o.ä. Maßnahmen notwendig (Egermann et al. 2005).

Mit Hilfe dieser Studie sollte ein definitives Kleintiermodell für die postmenopausale, senile und steroidinduzierte Osteoporose geschaffen und etabliert werden. Zunächst wurden die Ratten einer OVX unterzogen und erhielten dann gruppenabhängig entweder eine Multidefizienzdiät (D) oder eine Behandlung mit Steroiden (S, Dexamethason). Die Tiere der Gruppe OVX+D, 3M sollten zur Untersuchung einer postmenopausalen, die der Gruppe OVX+D, 12M bzw. 14M zur Analyse einer senilen Osteoporose sowie die steroidbehandelten Ratten der Gruppe OVX+S zur Erforschung einer steroidinduzierten Osteoporose dienen.

Es zeigten sich insbesondere im spongiösen Knochen des Wirbelkörpers L3 der Ratten deutliche Veränderungen durch die Ovariectomie kombiniert mit Multidefizienzdiät bzw.

Ovarektomie plus Steroidbehandlung im Vergleich zur den Sham-Tieren. Im Folgenden sollen diese Veränderungen diskutiert werden.

### **5.1 Die Ratte als Kleintiermodell für die Osteoporoseinduktion**

Obwohl Ratten nicht alle Parameter betreffend dem menschlichen Knochen, insbesondere dem systemisch erkrankten Knochen des Menschen, entsprechen, können sie wichtige Informationen zum besseren Verständnis der Pathogenese der Knochenerkrankungen und deren Therapien liefern. Die Testung neuer medikamentöser Therapieansätze in ovariectomierten Ratten und die daraus resultierenden Ergebnisse besaßen schon oft sehr gute Vorhersagekraft für die klinische Wirksamkeit bei postmenopausalen Frauen (Cao et al. 2002; Costa et al. 2009; Kalu 1991; Turner 2001).

Ein geeignetes Tiermodell sollte mindestens die drei folgenden Kriterien erfüllen: Zweckmäßigkeit bzw. Einfachheit, Relevanz und Angemessenheit. Relevanz bedeutet, dass die zu testenden Parameter sich im Tiermodell und beim Menschen vergleichbar verhalten sollten. Angemessenheit ist gegeben, wenn die Kombination anderer Faktoren das jeweilige Tiermodell als das geeignetste zur Untersuchung der Fragestellung erscheinen lässt. (Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.) 1981)

In den Richtlinien der FDA (Food and Drug Administration) wird die ovariectomierte Ratte als geeignetes Tiermodell zur Testung neuer Osteoporose-Therapien angesehen. Gezüchtete Ratten sind einfach und relativ günstig zu halten, leicht verfügbar, genetisch sehr ähnlich und die ethischen Bedenken sind nicht allzu hoch. Sie verfügen über eine Spontanovulation, sind polyöstrisch, d.h. sie haben mehrere Sexualzyklen pro Jahr (Dauer 4-5 Tage), und man kann leicht die Lichtexposition, Luftfeuchtigkeit und Umgebungstemperatur standardisieren, um jahreszeitliche Schwankungen auszuschließen. Ratten haben lediglich eine Lebenserwartung von 3-4 Jahren, sodass Studien zur Untersuchung von altersabhängigen Veränderungen möglich sind (Rodgers et al. 1993). Weiterhin gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen und Ergebnisse in der Literatur zur Physiologie und Pharmakologie der Laborratten. Da sie größer sind als Mäuse, können auch einige orthopädisch-unfallchirurgische Eingriffe an ihnen durchgeführt werden. So werden immer häufiger Knochendefekte an den langen Knochen der Ratten induziert, um beispielsweise weitere Erkenntnisse über die Frakturheilung unter verschiedensten Umständen gewinnen zu können. Inzwischen gelten Kleintier-Osteoporosemodelle als bewährte, reproduzierbare Modelle zur Untersuchung von Frakturheilungen. (Duque & Watanabe 2011; Egermann et al. 2005; Cao et al. 2002; Turner 2001)

Nachteile bei der Nutzung der Ratte als Tiermodell ergeben sich durch die geringe Körpergröße der Tiere. So haben Ratten beispielsweise nur ein sehr geringes Blutvolumen, sodass keine ausgedehnten Blutentnahmen möglich sind. Weiterhin haben sie nur eine geringe Lebenserwartung, was jedoch auch als Vorteil angesehen werden kann. Sie haben einen hohen Grundumsatz und sind nachtaktiv. (Rodgers et al. 1993)

All diese Aspekte müssen bei der Wahl des Tiermodells und bei der Interpretation der Ergebnisse mitbedacht werden.

### ***Die ovariectomierte Ratte***

Die ovariectomierte Ratte ist das am häufigsten genutzte Tiermodell für die postmenopausale Osteoporose. Sie zeigt nach der OVX einen zweiphasigen Knochenverlust. Hundert Tage nach OVX kommt es zu einem rapiden Knochenmassenverlust begleitet von maximal erhöhtem Knochenumbau, der von einer relativen Stabilisierung der Knochenmasse auf osteopenem Niveau gefolgt ist. Anschließend kommt es nach ungefähr 270 Tagen zu einer Phase des langsamen Verlusts spongiöser Knochenmasse. (Duque & Watanabe 2011; Wronski et al. 1988)

Man findet bei diesem Tiermodell ein Ungleichgewicht im Knochenmetabolismus mit Überwiegen des Knochenabbaus, sodass es sich bei einer kurzen Standzeit durchaus als Modell für postmenopausalen spongiösen Knochenverlust eignet. Über einen längeren Zeitraum betrachtet ist der Knochendichteverlust allerdings geringer als beim humanen osteoporotischen Knochen, sodass zusätzliche Maßnahmen nötig sind, um ein mit dem Menschen vergleichbares Modell zu schaffen. Weiterhin wird dieses Tiermodell dadurch limitiert, dass es keine Osteone mit Havers-Kanälen im kortikalen Knochen, keinen Knochenumbau durch BMUs bei jungen Tieren und keine Unterdrückung der Osteoblastenaktivität in späteren Stadien der Östrogendefizienz gibt. Des Weiteren entwickelt die Östrogen-defiziente Ratte keine Frakturen, wobei eine erhöhte Frakturanfälligkeit als ein Kennzeichen der Osteoporose des Menschen gilt. (Egermann et al. 2005; Duque & Watanabe 2011; Kalu 1991)

Aufgrund dessen beschreibt Kalu 1991 die ovariectomierte Ratte viel eher als Modell von postmenopausalem oder Ovariectomie-induziertem Knochenmassenverlust und nicht als ein Modell für eine postmenopausale Osteoporose.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ovariectomierte Ratte die drei Mindestkriterien für ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung des postmenopausalen Knochenverlustes erfüllt. Sie ist leicht zu halten und bereits mehrfach konnte gezeigt werden, dass es viele Parallelen im Knochenmetabolismus zu dem des Menschen gibt. Das Tiermodell ist bereits sehr gut untersucht und auch die

übrigen relevanten Faktoren machen die ovariectomierte Ratte zum geeigneten Tiermodell, um neue Erkenntnisse über die postmenopausale Osteoporose und die Wirksamkeit neuer Therapien beim Menschen zu gewinnen. (Kalu 1991)

Rodgers et al. 1993 empfehlen, die Ratte vor allem zur initialen Überprüfung neuer Therapieansätze zu nutzen, bevor man die gewonnenen Erkenntnisse bei anderen Spezies bestätigt und in klinischen Studien am Menschen testet.

### ***Die ovariectomierte und mangelernährte Ratte***

Wie zuvor beschrieben, reicht eine Ovariectomie alleine nicht aus, um in den Knochen der Ratte einen mit dem Menschen vergleichbaren Knochendichteverlust zu induzieren, sodass zusätzliche Maßnahmen nötig sind (Egermann et al. 2005; Moriya et al. 1998). Dabei wurde zur Untersuchung der postmenopausalen und senilen Osteoporose jeweils zusätzlich zur Ovariectomie eine Multidefizienzdiät gewählt, da diese durchaus der tatsächlichen Situation in der Bevölkerung entspricht (sehr weit verbreiteter Kalzium- und Vitamin D-Mangel) (Aerssens et al. 1996; Chapuy et al. 1997; Holick et al. 2005; Bartl & Bartl 2011). Weiterhin wurde zur Induktion einer senilen Osteoporose eine Langzeitbehandlung bei langen Standzeiten durchgeführt, da dies Voraussetzungen für das Entwickeln einer senilen Osteoporose sind.

Bei Aerssens et al. 1996 und French et al. 2008 heißt es auch, dass eine Ovariectomie alleine nicht ausreicht, um einen kortikalen Knochenschwund in Ratten zu induzieren, da sie über eine effizientere Kalziumaufnahme verfügen als Menschen. Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass eine Ovariectomie kombiniert mit einer Kalziummangeldiät eine Osteoporose bei dem Tiermodell Ratte erzeugt (Moriya et al. 1998). Es ist eine zusätzliche kalziumarme Diät notwendig, um eine kortikale Osteopenie zu induzieren. Da bei einer senilen Osteoporose sowohl der trabekuläre als auch der kortikale Knochen betroffen sind, ist die kortikale Osteopenie überaus wichtig, um ein mit dem Menschen vergleichbares Tiermodell zu erhalten. Daher kann man festhalten, dass die ovariectomierte Ratte ohne weitere Behandlung als unpassendes Tiermodell für die senile Osteoporose gilt (French et al. 2008).

### ***Die kortikosteroid-induzierte Osteoporose im Tiermodell***

Die Behandlung mit Kortikosteroiden verändert den Knochenmetabolismus und verursacht eine Osteoporose. Durch einen sinkenden Knochenaufbau kommt es zu einer verminderten Knochenmasse bei lediglich minimalen Veränderungen des Knochenabbaus. Die glukokortikoid-induzierte Osteoporose unterscheidet sich von der postmenopausalen und senilen, entspricht im Tiermodell aber am ehesten dem osteoporotischen Knochen des Menschen. Insgesamt konnte bei Tiermodellen, bei

denen die OVX mit Steroidbehandlung kombiniert wurde, der stärkste Knochenmassenverlust induziert werden. Bei einer Langzeit-Steroidbehandlung kommt es allerdings zu verschiedenen Nebenwirkungen, insbesondere des Immunsystems. (Egermann et al. 2005)

Aufgrund der zuvor genannten Erkenntnisse wurde in der vorliegenden Arbeit die OVX kombiniert mit einer Steroidbehandlung zur Induktion einer steroidinduzierten Osteoporose genutzt. Es wurde Dexamethason als Glukokortikoid zur Osteoporoseinduktion getestet.

## 5.2 Semiautomatisierte histomorphometrische Auswertung

Gemäß Definition ist die Osteoporose eine systemische Skeletterkrankung, die sich durch eine verminderte Knochenmasse und eine verschlechterte Mikroarchitektur des Knochengewebes auszeichnet. Die Osteoporose ist gekennzeichnet durch ein Ungleichgewicht im Knochenmetabolismus bei Überwiegen des Knochenabbaus.

Da der spongiöse Knochen eine sehr große Angriffsfläche für den Knochenabbau durch Osteoklasten bietet, werden zunächst vor allem die horizontalen Knochenbälkchen abgebaut, während die vertikalen noch länger stehen bleiben. 60-80% der Knochenstärke sind abhängig von der Knochendichte. So bewirkt ein Absinken der Knochendichte von 10-15% eine Verdopplung des Frakturrisikos (Bartl & Bartl 2011). Die restliche Knochenstärke ist bedingt durch die Qualität des Knochens. Im Knochen entstehen immer wieder Mikrofrakturen, wodurch es zu verminderter Belastbarkeit kommt. Eine vorangegangene Ausdünnung der Knochenbälkchen begünstigt die Zerstörung der Mikroarchitektur des Knochens. Die freistehenden Knochenbälkchen, die durch den Verlust ihrer Knotenpunkte mechanisch funktionslos sind, werden abgebaut. Wenn die vielen Mikrofrakturen nicht ausheilen, kommt es zur Fraktur des ganzen Knochens. (Bartl & Bartl 2011)

Histologisch findet man bei einer Osteoporose ein zerstörtes spongiöses Netzwerk, rarefizierte, verschmälerte Trabekel bei vergrößertem Trabekelabstand sowie im späteren Krankheitsstadium eine dünne Kompakta. Des Weiteren zeigen sich das sogenannte „Knopfphänomen“ durch Unterbrechung der Bälkchenstruktur sowie eine Abnahme der Knotenpunkte der Spongiosa, woraus eine Instabilität resultiert. Auch ein minderwertiger Aufbau der Knochenmatrix mit mangelhafter Mineralisation ist als Ursache für osteoporotisch bedingte Frakturen beschrieben. (Bartl & Bartl 2011; Egermann et al. 2005)

Bei dem hier genutzten Kleintiermodell Ratte sollten durch die verschiedenen Behandlungen unterschiedliche Osteoporoseformen induziert werden. Die

beschriebenen typischen Veränderungen der Knochenstruktur sowie des Knochenmetabolismus bei der Osteoporoseinduktion sollten mit Hilfe enzym- und immunhistochemischer Färbemethoden analysiert und sowohl deskriptiv als auch quantitativ ausgewertet werden. Die quantitative Auswertung sollte möglichst kostengünstig, schnell, automatisiert, reproduzierbar und zeitlich sowie örtlich flexibel durchführbar sein. Nach Austesten verschiedener Bildbearbeitungsprogramme konnten Methoden zur semiautomatisierten Analyse der Trabekeloberflächen mittels ImageJ sowie der Trabekelflächen mittels ImageJ und GIMP etabliert werden.

Die Bildbearbeitungssoftwares ImageJ und GIMP zählen beide zur Freeware, deren Erwerb kostenlos ist. Weiterhin sind beide Programme sehr benutzerfreundlich, sodass eine einfache, semiautomatisierte und reproduzierbare quantitative Analyse der zu betrachtenden Parameter möglich war.

Eine komplett automatisierte Auswertung durch eine Software war leider nicht möglich, da beispielsweise eine Unterscheidung der gefärbten Bereiche im Trabekelwerk von denen im Knochenmark erfolgen musste, was nur im Rahmen einer Auswertung durch Menschen gewährleistet werden kann.

### **5.3 Kurzzeitbehandlung als Modell einer postmenopausalen Osteoporose**

Die postmenopausale Osteoporose (=Typ-I-Osteoporose) ist vor allem durch Östrogenmangel bedingt und kann theoretisch bei beiden Geschlechtern auftreten, betrifft jedoch zu 80% postmenopausale Frauen (Herold 2012; Netter & Böttcher 2001). Der Östrogenmangel führt zu verminderter Knochenmasse. Durch den Östrogenmangel kommt es zu erhöhter Bildung resorptiver Faktoren, wodurch vermehrt Osteoblasten und -klasten bei verlängerter Lebensdauer der Osteoklasten und gleichzeitig verkürzter Lebensdauer der Osteoblasten entstehen. So kommt es zu einem für die postmenopausale Osteoporose charakteristischen gesteigerten Knochenumsatz („high turnover“) mit einem Ungleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau mit Überwiegen des Knochenabbaus. Weitere Ursache sind die fehlenden Östrogenwirkungen auf Darm und Nieren. (Reid 2011)

Das aktuell am häufigsten genutzte Tiermodell für eine postmenopausale Osteoporose ist die ovariectomierte Ratte. Bei kurzen Standzeiten konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich die ovariectomierte Ratte durchaus als Modell für den postmenopausalen spongiösen Knochenverlust eignet. Durch die Ovariectomie kommt es bei den Ratten zu einem erhöhten Knochenumsatz mit Überwiegen des Knochenabbaus, der zu einem Knochenverlust führt. (Thompson et al. 1995; Kalu 1991; Wronski et al. 1988)

Auch Chen et al. 2007 berichten, dass es bei ovariectomierten Mäusen zu einem erhöhten Knochenumsatz kommt, der insgesamt einen Knochenverlust, eine verminderte Knochendichte und geringeren Knochenkalziumgehalt bedingt.

Wie bereits von Kalu 1991 beschrieben, haben der postmenopausale Knochenmassenverlust und der durch Ovariectomie-bedingte Knochenverlust in der Ratte viele Ähnlichkeiten. So kommt es jeweils initial zu einer schnellen Knochenverlustphase mit Überwiegen des Knochenabbaus. Auf diese schnelle folgt eine langsame Phase, der spongiöse Knochenverlust ist größer als der kortikale und es kommt zu einer verminderten enteralen Kalziumresorption. Weiterhin reagiert der Knochen ovariectomierter Ratten vergleichbar auf verschiedene Osteoporose-Therapien, sodass dieses Modell sich gut zur Austestung neuer Therapieansätze eignet. (Kalu 1991; Cao et al. 2002; Costa et al. 2009)

Es konnte gezeigt werden, dass eine Östrogengabe den bei der ovariectomierten Ratte beobachteten erhöhten Knochenumsatz und Knochenverlust vollständig verhindern kann, was den Östrogenmangel als Ursache der postmenopausalen Osteoporose bestätigt (Thompson et al. 1995).

Das Alter, in dem die Ratten einer Ovariectomie unterzogen werden, muss gut bedacht werden, damit der durch Östrogenmangel induzierte Knochenverlust mit dem postmenopausalen Knochenverlust des Menschen vergleichbar ist. Die wachsende Ratte reagiert beispielsweise deutlicher auf eine Ovariectomie als die ältere Ratte. In den Wirbelkörpern kommt es zu einem Knochenmassenverlust durch Verschmälerung der Trabekel, in der Tibia durch Verringerung der Trabekelanzahl. (Thompson et al. 1995)

In der Literatur sind sowohl das „mature rat model“ (erwachsene Rattenmodell) als auch das „aged rat model“ (gealterte Rattenmodell) als Tiermodelle für postmenopausalen Knochenverlust beschrieben. Das „aged rat model“ hat mehrere Vorteile. Einerseits hat man Tiere, deren Skelett ausgereift ist, denn auch die postmenopausale Osteoporose betrifft den reifen Knochen. Andererseits kann man sicher sein, dass die beobachteten Veränderungen auf die Hormondefizienz und nicht auf gesteigerten Knochenaufbau bei jüngeren Tieren bzw. altersbedingten Knochenverlust zurückzuführen sind. Es wird empfohlen, 12 Monate alte Ratten für das „aged rat model“ zu benutzen, da gezeigt werden konnte, dass mit 12 Monaten die Knochenparameter ein Plateau erreichen, und bis zum Alter von 24 Monaten weitgehend stabile Werte zu verzeichnen sind (Kalu et al. 1989). Als Nachteile des „aged rat models“ wären zu nennen, dass die Tiere relativ teuer sind und eine lange Zeit vergeht, bevor man Ergebnisse erhält. In der Literatur werden alternativ auch 9



Monate alte ovariectomisierte Ratten zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose empfohlen (Jee & Yao 2001; Kalu et al. 1989).

Im Gegensatz dazu ist das „mature rat model“ viel leichter verfügbar, günstiger, und die Auswirkungen der Ovariectomie sind schon kurz nach dem Eingriff zu verzeichnen. Bereits in den ersten 100 Tagen nach einer Ovariectomie wurde eine Phase schnellen Knochenverlustes mit deutlich erhöhtem Knochenmetabolismus beschrieben, anschließend kommt es zu einer Stabilisierung (Wronski et al. 1988; Wronski et al. 1989; Wronski et al. 1985). Diese Veränderungen im Knochenmetabolismus zeigen sich auch bei der postmenopausalen Osteoporose. Als ideales Alter für das „mature rat model“ werden 3 Monate angegeben (Kalu 1991). Ein Nachteil des „mature rat models“ ist, dass das Knochenwachstum zu diesem Zeitpunkt zwar verlangsamt, jedoch noch nicht gestoppt ist. Man sollte daher anhand einer Sham- und einer Kontrollgruppe zu Studienbeginn überprüfen, ob es sich tatsächlich um Knochenmassenverlust handelt. (Kalu 1991; Jee & Yao 2001)

Der Knochendichteverlust ist allerdings über einen längeren Zeitraum betrachtet geringer als beim menschlichen osteoporotischen Knochen, sodass die ovariectomisierte Ratte mit einer langen Standzeit als ungeeignetes Modell einer postmenopausalen Osteoporose gilt. Es sind also weitere Maßnahmen notwendig, um ein Modell zu schaffen, das tatsächlich mit dem menschlichen Knochen vergleichbar ist, weshalb in dieser Arbeit zusätzlich eine Defizienzdiät verabreicht wurde. (Duque & Watanabe 2011; Thompson et al. 1995)

Nach einer Standzeit von 3M zeigten sich bei OVX+D verschmälerte, zentral rarefizierte Trabekel, die überwiegend vertikal angeordnet und im Vergleich zur Sham-Gruppe deutlich weniger vernetzt waren. Alles in allem sah man somit histologisch das typische Bild eines osteoporotischen Knochens.

Weiterhin zeigten sich in dieser Gruppe drei Monate nach Ovariectomie bei der **ALP**-Färbung eine signifikant erhöhte STS/TTS im Vergleich zur Sham-Gruppe. Die alkalische Phosphatase (ALP) ist auf der Zellmembran der Osteoblasten lokalisiert und gilt als Kennmolekül der Osteoblastendifferenzierung (Benninghoff & Drenckhahn 2008) sowie als Marker der Osteoblastenaktivität. ALP kann Phosphatverbindungen spalten, wodurch anorganisches Phosphat freigesetzt wird, was wiederum an Kalzium binden kann. Somit kann Hydroxylapatit gebildet werden. Die ALP wird von Osteoblasten freigesetzt und reguliert gemeinsam mit anderen Enzymen die Mineralisierung der Knochenmatrix. Sie kann beispielsweise Pyrophosphat, einen Inhibitor der Hydroxylapatit-Bildung, hydrolysieren, wodurch anorganisches Phosphat

freigesetzt wird. ALP kann somit die Mineralisierung regulieren. (Balcerzak et al. 2003; Hessle et al. 2002; Hui & Tenenbaum 1998; Orimo & Shimada 2008)

Die Expression von ALP wird durch eine erhöhte Kalzium-Konzentration gehemmt (Anh et al. 1998). Die hier beobachtete erhöhte Osteoblastenaktivität spiegelt den für eine postmenopausale Osteoporose charakteristischen erhöhten Knochenumsatz wider.

Die **TRAP**-Aktivität gilt als Marker des Knochenumsatzes, insbesondere der osteoklastären Knochenresorption (Scarnecchia et al. 1991; Janckila et al. 2001).

Es zeigte sich bei den Tieren der Gruppe OVX+D nach 3M eine höhere Osteoklastenaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe. Auch dieses Ergebnis passt sehr gut zur postmenopausalen Osteoporose, bei der es zu einem erhöhten Knochenumbau mit Überwiegen des Knochenabbaus kommt.

Sowohl die Analyse der Toluidinblau-Färbung als auch die Ergebnisse der Enzymhistochemie weisen auf einen gesteigerten Knochenumsatz mit Überwiegen des osteoklastischen Knochenabbaus hin und stützen somit die Annahme, dass hier tatsächlich eine postmenopausale Osteoporose induziert wurde.

Bei der immunhistochemischen Färbung osteoanaboler Enzyme konnte man im Vergleich zur Sham-Gruppe eine vor allem flächenmäßig ausgedehntere Färbung feststellen.

**Biglycan** (BGN) gehört zu den kleinen leucinreichen Proteoglykanen (=SLRPs=small leucin-rich proteoglycans) der nicht-kollagenen Knochenmatrix. Es kontrolliert die Knochenmasse durch Beeinflussung des Knochenaufbaus sowie der Matrixmineralisierung und spielt insbesondere eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Kollagenfibrillogenese (Xu et al. 1998; Ameye & Young 2002; Douglas et al. 2006; Parisuthiman et al. 2005). Bianco et al. 1990 beschrieben, dass Biglycan überwiegend auf der Zelloberfläche verschiedenster Zellen wie beispielsweise Osteoblasten und Osteozyten, teilweise auch perizellulär in der Matrix zu finden sei und möglicherweise eine Rolle bei der Zellregulation spielen könnte. Weiterhin konnten sie Biglycan in neugebildeter Knochenmatrix und in den dünnen Schichten unmineralisierter Matrix, die die Osteozytenlakunen und Knochenkanälchen umgeben, nachweisen.

BGN-defiziente Mäuse sind bei Geburt normal, erreichen jedoch durch unzureichende Zunahme an Knochenmasse nur eine geringe „peak bone mass“ (Höchstwert der Knochenmasse) (Xu et al. 1998). Da eine niedrige „peak bone mass“ als ein Hauptrisikofaktor für eine Osteoporose gilt, entwickeln die Tiere einen osteoporotischen Phänotyp durch reduzierten Knochenanbau und durch eine mit zunehmendem Alter deutlich werdende, erniedrigte Knochenmasse. Aufgrund dieser Beobachtungen lässt sich sagen, dass sich BGN-defiziente Mäuse als Tiermodelle zur

weiteren Untersuchung des Knochenmetabolismus und der Rolle der EZM-Proteine bei Osteoporose eignen. (Xu et al. 1998)

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Biglycan- sowie generell SLRP-Defizienz bei Mäusen zu qualitativen und quantitativen Defekten der Kollagenfibrillen Typ I und so zu einer Reihe muskuloskeletaler Erkrankungen (z.B. Osteoporose, Osteoarthritis, Muskeldystrophie, Ehlers-Danlos-Syndrom) führen können. Obwohl das Fehlen verschiedener SLRPs zu unterschiedlichen Defekten führt, greifen beim Fehlen mehrerer SLRPs Kompensationsmechanismen, sodass man von überlappenden Funktionen der einzelnen Proteoglycane ausgehen kann. (Ameys & Young 2002)

Chen et al. 2004 und Parisuthiman et al. 2005 konnten zeigen, dass Biglycan die BMP-4 induzierte Osteoblastendifferenzierung steuert und so neben den bisher genannten Funktionen auch Wachstumsfaktoren reguliert, um die Osteoblastendifferenzierung und -funktion zu kontrollieren. BGN moduliert durch Osteoblasten und deren Vorläuferzellen auch die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität, also neben dem Knochenauf- auch den Knochenabbau, und reguliert somit generell den Knochenmetabolismus. Daher kommt es bei BGN-Defizienz und der daraus resultierenden defekten Osteoblastenfunktion zu einem Ungleichgewicht in der Proliferation und Differenzierung der Knochenzellen. Infolgedessen konnten Bi et al. 2006 bei BGN-Defizienz eine gesteigerte Osteoklastenbildung (TRAP-positive multinukleäre Zellen) sowie eine erhöhte Osteolyse beobachten. Bei Nielsen et al. 2003 wurde nachgewiesen, dass die BGN-defizienten Tiere vor durch Östrogenmangel induziertem, erhöhtem Knochenumsatz sowie Knochenmassenverlust geschützt waren. (Bi et al. 2006; Nielsen et al. 2003)

Bei der Diätgruppe ließ sich Biglycan nach 3M überwiegend an der Trabekeloberfläche und den angrenzenden Bereichen (Osteoblasten, neu gebildete Knochenmatrix) darstellen. Die Färbung war ausgedehnter als bei der Sham-Gruppe, passend zum „high turnover“-Knochenmetabolismus bei einer postmenopausalen Osteoporose.

**Fibronectin** ist ein EZM-Glykoprotein, das für Zelladhäsion verantwortlich ist und eine Rolle in der frühen Phase der Knochenbildung, insbesondere der Osteoblastendifferenzierung, spielt (Mathews et al. 2012; Globus et al. 1998; Sasano et al. 2000). Linsley et al. 2013 konnten zeigen, dass Fibronectin die Differenzierung der menschlichen mesenchymalen Stammzellen in Richtung Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten einleiten kann, jedoch alleine nicht zur abschließenden Differenzierung ausreichend ist. Auch scheint Fibronectin ein Überlebensfaktor für reife Osteoblasten zu sein, da bei fehlender Bindung bzw. Präsenz in vitro vermehrt Apoptose zu beobachten war (Globus et al. 1998). Es wird vermutet, dass das Überleben reifer Osteoblasten entweder aufgrund eines durch Adhäsion übertragenen

Überlebensfaktors und/oder durch die allgemeine EZM-Integrität unterstützt wird (Globus et al. 1998). Man geht davon aus, dass mit zunehmender Knochenreifeung bestimmte Strukturen wie Fibronectin abgebaut werden (Sasano et al. 2000).

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Fibronectin konnte im neu gebildeten oder mineralisierten Knochen keine bzw. eine sehr geringe Färbung nachgewiesen werden, es zeigten sich lediglich in den knorpeligen Anteilen positive Farbreaktionen. Während sich bei der Sham-Gruppe nach 3M Fibronectin an den Knochenoberflächen und perizellulär um die Osteozyten darstellen ließ, war die Färbung bei der Gruppe OVX+D nach 3M meist an den Knochenoberflächen und schmalen angrenzenden Bereichen des Knochens gelegen. Da Fibronectin bei der Zelladhäsion und bei der Differenzierung der Osteoblasten eine Rolle spielt, war zu erwarten, dass sich eine Farbreaktion perizellulär und an der Knochenoberfläche zeigt. Bei der Diätgruppe war die Färbung neben der Trabekeloberfläche auch auf die angrenzenden Bereiche ausgedehnt, was auf einen erhöhten Knochenmetabolismus hinweisen könnte.

**Osteocalcin** (OCN) ist ein Protein, das auch „bone  $\gamma$ -carboxylglutamic acid-containing protein“ oder BGP genannt wird und einen großen Teil der extrazellulären, nicht-kollagenen Knochenmatrix ausmacht. Es wird von Osteoblasten in den späten Stadien der Osteoblastendifferenzierung gebildet und bindet an Hydroxylapatit und Kalzium. OCN wird Vitamin K-abhängig carboxyliert, erhält dadurch seine hohe Affinität zu Mineralien, insbesondere Kalzium, und wird in die EZM des Knochens eingebaut. Un- bzw. untercarboxyliertes OCN hat eine geringe Affinität zum Knochen und wird in den Blutkreislauf sezerniert. Des Weiteren wird OCN auch während des Knochenabbaus frei und gelangt in den Blutkreislauf, wo sowohl carboxyliertes als auch un- und untercarboxyliertes OCN nur eine kurze Halbwertszeit besitzt. Osteocalcin ist einerseits ein Inhibitor der Knochenmineralisation, andererseits reguliert es zusätzlich den Knochenumbau durch Beeinflussung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität sowie der Osteoblastenreifeung (Ishida & Amano 2004). OCN wird in Anwesenheit von Calcitriol vermehrt gebildet und galt als Marker der Osteoblastenaktivität bzw. des Knochenaufbaus, wird aktuell aber eher als Marker des Knochenmetabolismus angesehen. (Neve et al. 2013; Hauschka et al. 1989; Benninghoff & Drenckhahn 2008; Duque & Watanabe 2011)

OCN ist im Gegensatz zum Osteoid in hohen Konzentrationen in der mineralisierten Knochenmatrix sowie in Dentin zu finden (Hauschka et al. 1989). Osteocalcin-defiziente Mäuse haben eine höhere (bzw. abnorm erhöhte) Knochenmasse bei erhöhtem Knochenaufbau (Ducy et al. 1996). Es kommt zur Zunahme der Knochensubstanz bei verminderter Bruchfestigkeit und Einengung des Markraums (Benninghoff & Drenckhahn 2008). Bei Kavukcuoglu et al. 2009 konnte eine erniedrigte

Carbonat-Substitution bei OCN-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, sodass vermutet wird, dass OCN durch Erhöhung der Carbonat-Substitution eine Rolle beim Wachstum von Hydroxylapatitkristallen spielt. Der Osteocalcin-Spiegel im Serum wird als Marker für die Osteoblastenaktivität und den Knochenmetabolismus bestimmt. Gemäss Hauschka et al. 1989 ist der Hauptanteil des OCNs im Serum neu synthetisiertes OCN, das sofort nach der Herstellung durch Osteoblasten in den Blutkreislauf sezerniert wird. Ivaska et al. 2004 konnten aufdecken, dass bei der Knochenresorption in vitro intakte OCN-Moleküle bzw. -fragmente frei werden und nachgewiesen werden können. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass bei verschiedenen Knochenerkrankungen auch durch die Knochenresorption zuvor in den Knochen eingebettetes OCN in den Kreislauf gelangt (Ivaska et al. 2004).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Osteocalcin in uncarboxylierter Form auch endokrine Funktionen hat, insbesondere im Glukosestoffwechsel, während die carboxylierte Form eine starke Affinität zu Knochen hat und an Hydroxylapatit und Kalzium bindet (Shao et al. 2015).

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Osteocalcin zeigten sich nach 3M sowohl bei OVX+D als auch bei der Sham-Gruppe überwiegend an der Knochenoberfläche, auf der die Osteoblasten zu finden sind, gefärbte Bereiche. Bei OVX+D waren auch die an die Knochenoberfläche angrenzenden Bereiche, die möglicherweise noch nicht vollständig mineralisiert waren, gefärbt, passend zu der erhöhten Osteoblastenaktivität. Allerdings waren die Unterschiede in der Farbreaktion im Vergleich zur Sham-Gruppe nicht sehr ausgeprägt. Bei French et al. 2008 wurde ein initialer Anstieg von Osteocalcin nach Ovariectomie beobachtet, der jedoch nach 4-6 Monaten nicht mehr zu verzeichnen war.

Tenascine sind EZM-Glykoproteine, die in verschiedenen Bindegeweben zu finden sind, zur Struktur der EZM beitragen und einen Einfluss auf die Zellen haben, mit denen sie in Kontakt stehen. **Tenascin C** wird vor allem während der Embryo- und Organogenese sowie unter pathologischen Umständen wie bei Wunden, Krebsleiden oder entzündlichen Prozessen exprimiert. Im Knochen haben insbesondere Tenascin C und W große Bedeutung und werden dort von Osteoblasten produziert. TNC spielt eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation osteoblastärer Zellen, hat einen Einfluss auf deren Zellmorphologie sowie die Fibronectin-Zell-Interaktionen und stimuliert die Aktivität der ALP. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression von TNC sowohl durch bestimmte Wachstumsfaktoren bzw. Signalproteine (z.B. TGF- $\beta$ , PDGF, Wnt-5a, BMP-2) als auch durch mechanische Belastung hervorgerufen wird. Tenascin C und W sind im Knochen auf der periostalen Knochenoberfläche, TNC auch im Bereich der endostalen Oberfläche und während der Ossifikation um die

osteogenen Zellen herum, zu finden, allerdings nicht im ausgereiften Knochen (Mackie et al. 1987). Wie bereits zuvor erwähnt, wird davon ausgegangen, dass EZM-Komponenten wie Fibronectin oder Tenascin C mit zunehmender Knochenreifung abgebaut werden (Sasano et al. 2000). (Chiquet-Ehrismann & Tucker 2004; Morgan et al. 2011; Chiquet et al. 2004; Mackie & Ramsey 1996)

Nach einer Standzeit von 3M war bei der Gruppe OVX+D überwiegend an den Knochenoberflächen sowie in der unmittelbaren Osteozyten-Umgebung TNC nachweisbar. Kortikal war auch teilweise die EZM gefärbt. Da sich keine deutliche Farbreaktion im Bereich der trabekulären EZM nachweisen ließ, ist hier von einem reifen Knochen auszugehen.

Bei der immunhistochemischen Färbung osteokataboler Enzyme zeigten sich im Vergleich zur Sham-Gruppe geringere Unterschiede als bei der Färbung osteoanaboler Enzyme.

Die **Carboanhydrase 2** (CA2) ist in Osteoklasten zu finden und spielt eine Rolle bei der osteoklastären Knochenresorption. Sie katalysiert die Bildung von  $H^+$  und  $HCO_3^-$  aus  $CO_2$  und  $H_2O$ .  $H^+$  wird anschließend in die Lakunen gepumpt,  $HCO_3^-$  gegen  $Cl^-$  ausgetauscht. Ist die CA2 defekt, führt dies zur sogenannten Marmorknochenkrankheit (Osteopetrose). Es wurden bereits mehrere Hemmstoffe (z.B. OPG) sowie Induktoren der CA2 (wie Sclerostin) in der Literatur beschrieben. (Benninghoff & Drenckhahn 2008; Chen et al. 2012; Kogawa et al. 2013)

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Carboanhydrase 2 war die Farbreaktion bei OVX+D flächenmäßig geringer als bei der Sham-Gruppe, einzelne Bereiche waren jedoch sehr deutlich gefärbt. Die gefärbten Bereiche lagen überwiegend um Knochenzellen sowie zur Knochenoberfläche hin, passend zu den Bereichen, in denen eine osteoklastäre Resorption stattfindet.

Im Rahmen des physiologischen Knochenremodellings findet immer eine gewisse osteoklastäre Resorption statt, was die großflächige Farbreaktion bei der Sham-Gruppe erklärt. Bei OVX+D war Carboanhydrase 2 nicht ganz so großflächig, aber dafür stellenweise intensiv nachweisbar, was ein Hinweis auf eine erhöhte, möglicherweise pathologische Osteoklastenaktivität in umschriebenen Bereichen sein könnte.

Die **MMP-9**, auch Gelatinase B genannt, wird im Knochen insbesondere von Osteoklasten gebildet und sezerniert. Sie spielt eine Rolle im Knochenmetabolismus beim Abbau der EZM, insbesondere beim Abbau von Kollagen I. Es konnte gezeigt werden, dass MMP-9 im osteoporotischen Knochen vermehrt gebildet wird. (Zhao et al. 1997; Hill et al. 1994)

Bei Faloni, Ana Paula de Souza et al. 2012 wurde nach Östrogengabe eine reduzierte Knochenresorption ohne Auswirkung auf die MMP-9 Expression beobachtet. In vitro wird die Expression von MMP-9 und Carboanhydrase 2 durch RANKL in Anwesenheit von IL-1 $\alpha$  induziert (Fujisaki et al. 2007). Auch Sundaram et al. 2007 konnten nachweisen, dass RANKL die MMP-9 Expression während der Osteoklastendifferenzierung reguliert.

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-MMP-9 ließ sich MMP-9 bei der Diätgruppe ubiquitär nachweisen, jedoch insbesondere an der Trabekeloberfläche, in der EZM und um die Osteozyten herum. Im Vergleich zur Sham-Gruppe wirkte vor allem der intensiv gefärbte Bereich flächenmäßig geringer, obwohl mit Hilfe der TRAP-Färbung eine erhöhte Osteoklastenaktivität bei der Diätgruppe nachzuweisen war. Bei Duque & Watanabe 2011 heißt es, dass MMPs bei der osteoklastären Knochenresorption im osteoporotischen Knochen keine zentrale Rolle spielen, was eine mögliche Erklärung für die hier beobachteten Ergebnisse sein könnte. Weiterhin wird beschrieben, dass die Knochenresorption im osteoporotischen Knochen dem normalem Knochenumbau ähnlich sei und daher als physiologisch angesehen werden könne (Duque & Watanabe 2011).

Östrogengabe scheint auf die MMP-9 Expression keine Auswirkungen zu haben (Faloni, Ana Paula de Souza et al. 2012), allerdings weiß man nicht, welche Auswirkungen eine Östrogendefizienz hat. Die erhöhte Osteoblastenaktivität in dieser Gruppe hätte zu einer Induktion von MMP-9 über RANKL führen können, was jedoch hier nicht der Fall zu sein schien.

**MMP-14** wird auch MT1-MMP (membrane type MMP) genannt, da diese membrangebunden auf Osteoklasten im Bereich der Haftzonen vorkommt (Benninghoff & Drenckhahn 2008). MT1-MMP-defiziente Mäuse entwickeln schwere Bindegewebserkrankungen wie Arthritis, Osteopenie, Minderwuchs, Weichteilfibrose oder Skelettdysplasie. Bei diesen Tieren sind kein Abbau und Umbau von unmineralisierter, kollagener EZM in den normalerweise MMP-14 exprimierenden Bereichen möglich. Dies deutet auf die wichtige kollagenolytische Funktion von MMP-14 im Bindegewebsumbau, insbesondere im Knochenremodelling, sowie in der Entwicklung, dem Wachstum und der Kontinuität des Bindegewebes im Körper hin. (Holmbeck et al. 1999)

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für die Osteozytogenese (aktiver invasiver Prozess des Einmauerns von lebenden Zellen in den wachsenden mineralisierten Knochen) die kontinuierliche Spaltung von Kollagen Typ I wichtig ist, was eine MMP-14-Aktivität erfordert. Auch die Entwicklung und Aufrechterhaltung osteozytärer Prozesse sowie die Bildung von Knochenkanälchen und somit die Vernetzung der



Osteozyten untereinander ist mit MMP-14-abhängigem Matrixabbau assoziiert (Holmbeck et al. 2005). MMP-14 spielt ebenfalls eine Rolle bei der Zellmigration (Takino et al. 2006). (Holmbeck et al. 2005)

Nach 3M konnte MMP-14 bei der Diätgruppe vor allem in den nach innen gerichteten Kortikalisbereichen sowie an der Trabekeloberfläche nachgewiesen werden. Die Färbung war flächenmäßig etwas kleiner, jedoch nicht weniger intensiv als bei der Sham-Gruppe. Insgesamt ließen sich hier jedoch keine deutlichen Unterschiede nachweisen. Da MMP-14 in den Haftzonen auf Osteoklasten vorkommt und keinen Aktivitätsmarker darstellt, kann es durchaus sein, dass hier auch bei unterschiedlicher Osteoklastenaktivität zwischen den Gruppen keine deutlichen Unterschiede in der Farbreaktion zu erwarten sind.

Insgesamt ließ sich in der Diätgruppe nach 3M eine erhöhte Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität sowie eine erhöhte Nachweisbarkeit osteoanaboler Enzyme darstellen. Diese Ergebnisse sowie die morphologischen Veränderungen bei Betrachtung der Paraffinschnitte der Wirbelkörper passen zu einer high-turnover Osteoporose. Die Färbung osteokataboler Enzyme konnte keine deutlichen Unterschiede im Vergleich zur Sham-Gruppe nachweisen, dies ist aber möglicherweise wie bereits erwähnt vor dem Hintergrund der beschriebenen physiologischen Knochenresorption im osteoporotischen Knochen zu sehen bzw. möglicherweise wäre eine höhere Aktivität (z.B. von MMP-9) erst nach einer längeren Standzeit detektierbar.

#### **5.4 Langzeitbehandlung als Modell einer senilen Osteoporose**

Eine senile Osteoporose muss vom physiologisch altersabhängigen Knochenschwund unterschieden werden. Zu den Komponenten, die zu einer senilen Osteoporose führen, gehören der mit zunehmendem Lebensalter einhergehende physiologisch altersabhängige Knochenverlust, die Postmenopause und die besonders in dieser Altersgruppe weit verbreitete Mangelernährung (Eiweiß, Vitamin D, Kalzium). Daher ist hier der Vergleich der Gruppen OVX+D (12M) und OVX+D (14M) mit den jeweiligen Sham-Gruppen besonders wichtig, um die Veränderungen des physiologischen Knochenschwundes zu beobachten, und mit denen nach erfolgter Behandlung (Östrogenmangel nach Ovariectomie und Multidefizienzdiät) vergleichen zu können.

Die senile Osteoporose ist durch einen gleichermaßen trabekulären und kortikalen Knochenverlust gekennzeichnet. Ätiologisch spielt zusätzlich zu den bereits genannten Faktoren wahrscheinlich zunehmender Bewegungsmangel auch eine Rolle.

Nach Erreichen der maximalen Knochendichte („peak bone mass“) und einer anschließenden Stabilisierungsphase kommt es ca. ab dem 30.-40. Lebensjahr mit Zunahme des Lebensalters zu einem kontinuierlichen Knochendichteverlust (physiologische Verminderung der Knochenmasse ungefähr 0,5% jährlich) (Herold 2012). Bei Frauen ist das Ausmaß des Knochendichteverlustes 5-10 Jahre postmenopausal erhöht (ca. 2%/Jahr) (Herold 2012), während die Abnahme der Knochendichte bei Männern konstant verläuft. In den ersten Jahren nach der Menopause ist der Knochenschwund trabekulär deutlich ausgeprägter als kortikal, jedoch wird der Unterschied mit zunehmender Zeit geringer. Ursache für den Knochendichteverlust ist ein reduzierter Knochenaufbau im Vergleich zum Knochenabbau, also eine erhöhte Osteoklastenaktivität im Vergleich zur Osteoblastenaktivität. (Reid 2011; Herold 2012)

Östrogenmangel führt wie bereits beschrieben zu verminderter Knochenmasse sowie zu einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochens und einer Verminderung der Knochenstärke (Reid 2011).

Der weit verbreitete Vitamin D-Mangel ist besonders bei älteren Menschen, vor allem bei Bewohnern von Alten- und Pflegeheimen, häufig auch kombiniert mit Protein- und Kalzium-Mangel, anzutreffen. Durch Vitamin D-Mangel kommt es zu einer verschlechterten Kalziumresorption und muskulären Balance sowie möglicherweise zum Auftreten einer Osteomalazie. Diese ist gekennzeichnet durch eine mangelnde Mineralisation des Osteoids verursacht durch Vitamin D-Mangel bei laborchemisch erhöhter alkalischer Phosphatase (Bartl & Gradinger 2009; Braun & Pfeilschifter 2010; Netter & Böttcher 2001). In der Literatur ist beschrieben, dass aufgrund des weit verbreiteten Vitamin D- und Kalzium-Mangels bei alten Patienten häufig eine Kombination aus Osteoporose, sekundärem Hyperparathyreoidismus und Osteomalazie anzutreffen sei, eine sogenannte „Osteoporomalazie“. (Bartl & Bartl 2011; Bartl & Gradinger 2009; Braun & Pfeilschifter 2010; Netter & Böttcher 2001)

Bei den beiden Diätgruppen, die als Modell für eine senile Osteoporose dienen sollen, zeigten sich nach 12M und 14M deutlich weniger Trabekel, die überwiegend kranial und kaudal am Rand des Wirbelkörpers lagen. Diese waren wider Erwarten nicht schmal, sondern eher kräftiger als bei der Sham-Gruppe und insgesamt, insbesondere nach 14M, von minderer Knochenqualität mit vielen mangelhaft mineralisierten, osteomalatisch wirkenden Bereichen. Aufgrund der Multidefizienzdiät litten diese Tiere unter Vitamin D-Mangel, was wiederum zu einer Osteomalazie führen kann.

Nach einer Standzeit von 12M zeigte sich bei der **ALP**-Färbung kein großer Unterschied in der Osteoblastenaktivität zwischen der Sham-Gruppe und OVX+D. Da

eine senile Osteoporose durch einen langsamen Knochenumbau („low turnover“) gekennzeichnet ist, entspricht die relativ niedrige Osteoblastenaktivität dem, was man vom Knochenmetabolismus bei einer senilen Osteoporose erwartet (Herold 2012). Allerdings konnte zum Zeitpunkt 14M wieder eine deutlich erhöhte Osteoblastenaktivität bei OVX+D im Vergleich zur Sham-Gruppe beobachtet werden. Dieses Ergebnis kann man nicht mit dem reduzierten Knochenmetabolismus bei einer Typ-II-Osteoporose vereinbaren.

Die erhöhte Osteoblastenaktivität bei OVX+D nach 14M könnte also durch eine Osteomalazie, verursacht durch die Multidefizienzdiät und einen dadurch entstandenen Vitamin D-Mangel, bedingt sein. Durch den Vitamin D-Mangel kommt es zu einer niedrigen Kalzium-Konzentration im Serum, wodurch es zu einem Anstieg des Parathormons (sekundärer Hyperparathyreoidismus) kommt. PTH wiederum stimuliert Osteoblasten, die die Entstehung von Osteoklasten induzieren. Es kommt zur Knochenresorption. Weiterhin ist eine erhöhte alkalische Phosphatase-Aktivität nachweisbar bei allerdings aufgrund des Kalzium-Mangels unzureichender Mineralisation des Osteoids. Die Expression von ALP wird durch eine erhöhte Kalzium-Konzentration gehemmt (Anh et al. 1998). (Lüllmann-Rauch 2006; Reuss-Borst 2014)

Wie bereits in der Literatur beschrieben, kommt es bei dem Tiermodell der ovariectomierten Ratte nach langandauernder Östrogendefizienz nicht zu einem reduzierten Knochenaufbau mit geminderter Osteoblastenfunktion (Wronski et al. 1989). Man müsste also davon ausgehen, dass die zusätzlich zur OVX verabreichte Diät keinen ausreichenden Effekt hatte und die Osteoblastenfunktion nicht suffizient vermindern konnte. Dagegen spricht allerdings einerseits die im Vergleich niedrigere Osteoblastenaktivität nach 12M und die nicht nur fehlende Minderung, sondern sogar erhöhte Osteoblastenaktivität nach 14M. Des Weiteren zeigten sich histologisch einige mindermineralisierte Bereiche, was eher die Vermutung einer entstandenen Osteomalazie bzw. Osteoporomalazie stützt.

Bei der **TRAP**-Färbung konnte nach 12M und 14M eine erhöhte Osteoklastenaktivität der ovariectomierten, diätetisch ernährten Ratten festgestellt werden. Gleichzeitig war nach 12M keine erhöhte Osteoblastenaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe zu verzeichnen, sodass die Beobachtungen nach 12M einer senilen Osteoporose mit einem langsamen Knochenumsatz mit insgesamt Überwiegen des Knochenabbaus entsprechen.

Nach 14M war jedoch nicht nur die Osteoklastenaktivität, sondern auch die Osteoblastenaktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe erhöht. Da bei der senilen Osteoporose eigentlich kein „high turnover“ beobachtet werden kann, eine erhöhte Osteoklastenaktivität aber Kennzeichen des Knochenmetabolismus im

osteoporotischen Knochen ist sowie eine erhöhte Osteoblastenaktivität als Kennzeichen einer Osteomalazie gilt, kann man bei der Gruppe OVX+D, 14M tatsächlich von einer Mischform aus Osteoporose und Osteomalazie ausgehen.

Das lässt somit den Rückschluss zu, dass dieses Modell ursprünglich unbeabsichtigt ein überaus realistisches Abbild des Knochenstatus alter Menschen sowie einer senilen Osteoporose zeigt, da wie von Bartl & Bartl 2011 beschrieben bei älteren Patienten häufig eine sogenannte „Osteoporomalazie“ vorliegt.

Bei Wronski et al. 1989 zeigte sich bei ovariectomierten Ratten viele Monate Postovarektomie eine Phase langsamen, späten Knochenverlustes, die jedoch ebenfalls mit erhöhtem Knochenumbau assoziiert war. Auch altersabhängiger Knochenverlust der Kontrolltiere war mit einem erhöhten Knochenumbau assoziiert. Da unsere Tiere jedoch zusätzlich eine Mangeldiät erhielten, sind die Ergebnisse nur sehr eingeschränkt vergleichbar.

Die immunhistochemische Färbung knochenanaboler EZM-Proteine zeigte bei OVX+D tendenziell einen größeren Anteil gefärbter Fläche nach 12M bzw. 14M, sowohl im Vergleich zu 3M als auch im Vergleich zur Sham-Gruppe.

Wie bereits beschrieben, lässt sich **BGN** in neugebildeter Knochenmatrix und in unmineralisierter Matrix nachweisen. Weiterhin heißt es bei Miao et al. 2001, dass die Expression von Biglycan in vivo im osteomalatischen Knochen, insbesondere in Osteozyten und der Knochenmatrix, vermehrt nachweisbar war. Anhand dieser Informationen war es nicht erstaunlich, dass der Anteil Biglycan-positiver Bereiche im trabekulären Knochen nach 12M und 14M im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant erhöht war. Bereits lichtmikroskopisch sah man die vielen mindermineralisierten Bereiche, die auf einen osteomalatischen Knochenstatus und vermehrte Knochenbildung mit gestörter Mineralisierung hinweisen.

Bei der Gruppe OVX+D zeigte sich nach 12M und 14M bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-**Fibronectin** eine großflächige trabekuläre Färbung, die von der Trabekeloberfläche ausging. Auch das intertrabekuläre Bindegewebe war deutlich gefärbt. Da es bei Sasano et al. 2000 heißt, dass der mineralisierte Knochen keine bzw. kaum eine Farbreaktion zeigt, kann man zusammen mit den Ergebnissen der anderen Färbungen davon ausgehen, dass sich diese Bereiche im Stadium der Knochenneubildung befinden, möglicherweise in den frühen Stufen der Osteoblastendifferenzierung. Alternativ könnte es natürlich auch ein Zeichen dafür sein, dass der Knochen schlecht mineralisiert, die EZM-Integrität zerstört ist, Fibronectin frei liegt und es dadurch zu einer positiven Farbreaktion kommt.

Bei der Färbung mit Anti-**Osteocalcin** zeigte sich nach 12M bei OVX+D eine ausgedehnte, intensive Farbreaktion, die sich von der Knochenoberfläche bis teilweise

über den ganzen trabekulären Knochen ausbreitete. Nach 12M und 14M waren auch die bindegewebigen Bezirke gefärbt. Nach 14M zeigte der Knochen im Gegensatz zu dem der Gruppe OVX+D nach 12M kaum eine Farbreaktion.

Diese beobachteten Ergebnisse passen auf den ersten Blick nicht sehr gut zu der durch die Färbung mit ALP detektierten Osteoblastenaktivität. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass sich die Osteoblasten nach 12M in einem späteren Differenzierungsstadium befinden und daher die ALP-Aktivität nicht sehr hoch, jedoch Osteocalcin weit verbreitet nachzuweisen war (OCN wird im Vergleich zur ALP später in der Osteoblastendifferenzierung, in der Phase der Matrixmineralisierung, exprimiert). Nach 14M zeigten sich die Knochen osteomalatisch verändert. Bei der Osteomalazie ist die Mineralisierung des Knochens gestört und da OCN insbesondere auch eine Rolle bei der Knochenmineralisierung spielt, ist es nicht verwunderlich, dass sich nach 14M wenig Osteocalcin im Knochen nachweisen ließ.

Nach 12M konnte **Tenascin C** bei OVX+D im Bereich der Trabekel- bzw. Kortikalisoberfläche sowie um die Osteozyten herum, jedoch im Gegensatz zur Sham-Gruppe auch zunehmend im Bereich der trabekulären EZM nachgewiesen werden. Nach 14M zeigte sich auch eine diffuse Farbreaktion in der trabekulären EZM und in den bindegewebigen Bereichen intertrabekulär. Diese beobachteten Veränderungen unterstützen die bisherigen Ergebnisse und Vermutungen einer möglichen Knochenneubildung (unmineralisierte Knochenmatrix, erhöhte Osteoblastenaktivität), da TNC in reifem Knochen nicht nachweisbar ist (Mackie et al. 1987). Hier ist TNC diffus trabekulär nachweisbar, was für frühere Stufen der Osteoblastendifferenzierung sprechen könnte. Alternativ könnte dies jedoch auch vor dem Hintergrund der Veränderungen bzgl. Fibronectin für unreife Osteoblasten bzw. eine Osteoblastendysfunktion aufgrund von möglicherweise fehlender mechanischer Stimulation sprechen. TNC und FBN gehören beide zu den Ankerproteinen der EZM und spielen eine wichtige Rolle für den Aufbau der EZM, welcher wiederum von mechanischer Stimulation abhängig ist. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TNC als Faktor für die Osteoblastendifferenzierung als auch generell die Osteoblastenproliferation abhängig von mechanischer Stimulation sind (Mackie & Ramsey 1996; Chiquet et al. 2004; Yan et al. 2012). Für eine veränderte EZM-Struktur durch fehlende mechanische Stimulation könnte auch sprechen, dass in den Sham-Gruppen sowohl TNC als auch FBN überwiegend im Bereich der Osteozyten nachweisbar gewesen sind, in den Diätgruppen diese nun eher trabekulär (oft von der Trabekeloberfläche ausgehend) detektiert werden konnten (El Khassawna et al. 2015).

Nach 12M und 14M waren die Farbreaktionen bei immunhistochemischer Färbung mit **Carboanhydrase 2** relativ großflächig, jedoch diffus über Trabekel und Kortikalis

verteilt. Nach 12M war die Intensität bei der Sham-Gruppe im Vergleich zu OVX+D geringer und bei OVX+D waren die Lokalisationen der gefärbten Bereiche zwischen den Tieren unterschiedlich. Insgesamt waren nach diesen Zeitpunkten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen zu sehen.

Sowohl nach 12M als auch nach 14M konnte **MMP-9** meist großflächig trabekulär, insbesondere in Richtung der Trabekeloberfläche sowie in den bindegewebigen Bereichen intertrabekulär nachgewiesen werden. Die Farbreaktion bei OVX+D wirkte zu beiden Zeitpunkten ausgedehnter und intensiver als bei der Sham-Gruppe.

Die beobachtete, etwas erhöhte MMP-9-Aktivität in der Diätgruppe passt gut zu der erhöhten osteoklastären Knochenresorption, die typisch für Osteoporose ist (El Khassawna et al. 2015). Allerdings ist sie nur ein wenig erhöht, passend zu der als physiologisch beschriebenen Knochenresorption im osteoporotischen Knochen (Duque & Watanabe 2011).

**MMP-14** konnte mittels IHC sowohl nach 12M als auch nach 14M diffus trabekulär und kortikal nachgewiesen werden. Insbesondere die Trabekeloberflächen waren stellenweise intensiv gefärbt wie auch die bindegewebigen Bereiche. Im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigten sich kaum Unterschiede in den Lokalisationen, außer dass die Farbreaktion nach 12M bei der Sham-Gruppe eher kortikal, bei der Diätgruppe trabekulär betont war.

Bei der Diätgruppe zeigte sich nach 12M und insbesondere nach 14M eine erhöhte Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, die durch eine vermehrte Farbreaktion von MMP-9 sowie osteoanaboler Enzyme bekräftigt wurde. Die erhöhte Osteoblastenaktivität ist typisch für eine Osteomalazie, die erhöhte Osteoklastenaktivität für eine Osteoporose. Die erhöhte Osteoklastenaktivität ist auch durch die Osteoblastenaktivität bedingt, da es über RANKL zu einer Aktivierung kommt.

### 5.5 Modell einer steroidinduzierten, sekundären Osteoporose

Die kortikosteroidinduzierte Osteoporose ist eine der bedeutendsten Formen der sekundären, medikamenteninduzierten Osteoporosen. Bereits nach einer Steroidtherapie von einigen Monaten überwiegt der Knochenkatabolismus und nach einer Langzeittherapie über mehrere Jahre kommt es bei 30-50% der Patienten zu einer manifesten Osteoporose. Bei der steroidinduzierten Osteoporose kommt es zu einem schnellen Knochenverlust, der in den ersten 6-12 Monaten besonders stark

ausgeprägt ist. Einige Erkrankungen, bei denen eine Steroidtherapie notwendig ist, tragen auch selbst zur Osteoporose bei. (Bartl et al. 2009)

Glukokortikosteroide führen zu einer verminderten intestinalen Kalziumresorption. Weiterhin haben sie auch antianabole Wirkungen auf den Knochenmetabolismus: Sie verursachen eine verminderte Osteoblastendifferenzierung bei erhöhter Osteoblastenapoptose, wodurch es zu einem geringeren Knochenaufbau kommt. Durch eine Suppression von LH und FSH kommt es zu einem niedrigen Östrogenspiegel. Dies führt zusammen mit erniedrigtem OPG und erhöhtem RANKL zu einem erhöhten Knochenabbau. Der trabekuläre Knochen und somit das Achsenskelett ist besonders betroffen, sodass man Frakturen vor allem in den Wirbelkörpern, Rippen und im Bereich der Femura findet. (Netter & Böttcher 2001; Bartl et al. 2009; Hofbauer et al. 1999)

Aaron et al. 1989 konnten zeigen, dass es im Menschen bei einer steroidinduzierten Osteoporose zu verschmälerten Trabekeln ohne Reduktion der Trabekelverbindungen bei erniedrigtem Knochenaufbau kommt. Lill et al. 2002 untersuchten die Veränderungen in der Knochenstruktur bei steroidbehandelten, ovariectomierten Schafen, die zusätzlich eine Vitamin D- und Kalzium-arme Diät erhielten. Es zeigten sich deutliche Veränderungen im trabekulären Knochen mit signifikant erniedrigter Trabekelzahl und -dicke bei signifikant erhöhtem Abstand zwischen den Trabekeln.

Es wurde gezeigt, dass Glukokortikoid-induzierter Knochenmassenverlust bei Menschen und Mäusen in zwei Phasen verläuft. Eine schnelle, frühe Phase, in der es zu einer erhöhten Osteoklastenanzahl durch eine verlängerte Lebensdauer der Osteoklasten (bei jedoch verringerter Neubildung) und somit zu initial erhöhter Knochenresorption kommt, und eine langsame, spätere Phase, in der es aufgrund von unzureichendem Knochenaufbau zu Knochenmassenverlust kommt. Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide in Osteoblasten und Osteozyten Apoptose induzieren können. (O'Brien et al. 2004; Weinstein et al. 1998; Weinstein et al. 2002)

Dies erklärt die im Verlauf verringerte Neubildung von Osteoklasten, da RANKL von Osteoblasten gebildet wird und die Osteoklastogenese induziert.

Bei der Gruppe OVX+S sah man nach drei Monaten dünne Trabekel, überwiegend vertikal angeordnet mit zentraler Rarefaktion und deutlich weniger Knotenpunkten als bei der Sham-Gruppe. Weiterhin zeigten sich viele leere Fettvakuolen. Insgesamt war die Spongiosa lichtmikroskopisch betrachtet also osteoporotisch verändert mit vermehrten Fettvakuolen durch die Steroide.

Bei den steroidbehandelten Tieren zeigten sich im Vergleich zur Sham-Gruppe nach drei Monaten Standzeit keine großen Veränderungen der Osteoblastenaktivität in der



**ALP-Färbung.** Die Ratten, die ovariectomiert wurden und Dexamethason erhielten, hatten eine etwas höhere Osteoblastenaktivität als die Sham-Gruppe. Die Tiere, die Methylprednisolon verabreicht bekamen, hatten eine geringere Osteoblastenaktivität.

Bei der steroidinduzierten Osteoporose kommt es eigentlich durch einen verminderten Knochenaufbau bei initial erhöhtem Abbau zum Verlust der Knochenmasse. Diese Veränderungen im Knochenaufbau konnten hier nur bei der Pilotgruppe OVX+Methylprednisolon beobachtet werden. Obwohl bei den mit Dexamethason behandelten Tieren keine Verringerung der Osteoblastenaktivität gezeigt werden konnte, konnte man dennoch deutlich den Verlust der Knochenmasse, die Ausdünnung der Trabekel und Vergrößerung des Trabekelabstands beobachten. Möglicherweise zeigen sich zu diesem Zeitpunkt die durch die Apoptose der Osteoblasten und Osteozyten hervorgerufenen Veränderungen im Knochenaufbau noch nicht.

Bei den mit Dexamethason bzw. Methylprednisolon behandelten Tieren konnte im Vergleich zur Sham-Gruppe lediglich eine minimal erhöhte Osteoklastenaktivität bei der **TRAP**-Färbung nach 3M gezeigt werden. Da das Trabekelwerk eindeutige Veränderungen in Richtung eines osteoporotisch veränderten Knochens zeigte und für eine steroidinduzierte Osteoporose eine reduzierte Knochenmasse durch verminderten Knochenaufbau bei weitgehend unverändertem Knochenabbau (lediglich initial erhöhter Knochenabbau) als typisch gilt, passt die weitgehend unveränderte Osteoklastenaktivität gut zu einer steroidinduzierten Osteoporose.

Die immunhistochemische Färbung mit Anti-**Biglycan** lieferte nach 3M bei der Steroidgruppe die geringsten gefärbten Bereiche, auch im Vergleich zur Sham-Gruppe. Da Biglycan als Marker der Osteoblastendifferenzierung und Knochenneubildung gilt, passt dieses Ergebnis gut zu einer steroidinduzierten Osteoporose.

Wie zuvor beschrieben, führen Glukokortikosteroide zu einer verminderten Osteoblastendifferenzierung und Fibronectin induziert u.a. die Differenzierung der Osteoblasten. Bei der Färbung mit Anti-**Fibronectin** zeigte sich passend dazu im Vergleich zur Sham-Gruppe und zur Gruppe OVX+D eine verminderte Farbreaktion. Gefärbte Bereiche sah man an der Trabekeloberfläche sowie perizellulär der Osteozyten.

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-**Osteocalcin** zeigte sich bei der Steroidgruppe überwiegend an den Knochenoberflächen, insbesondere des spongiösen Knochens, eine positive Farbreaktion. Im Vergleich zu den anderen Gruppen zum Zeitpunkt 3M fiel die Farbreaktion jedoch schwächer aus.

Auch in der Literatur ist beschrieben, dass eine Therapie mit Kortikosteroiden zu einem raschen Abfall von Osteocalcin (im Serum) führt (Hozuki et al. 2010, Godschalk & Downs 1988, 1988; Chmielnicka et al. 2014). Es ist bekannt, dass Kortikosteroide zu

einer verminderten Osteoblastenaktivität führen, was wiederum zu der im Vergleich zu den anderen Gruppen schwächeren Farbreaktion führen könnte, da OCN von Osteoblasten produziert wird.

**Tenascin C** spielt eine Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung. Da diese durch Glukokortikosteroide gehemmt wird, zeigte sich eine im Vergleich zu den anderen Gruppen verhaltenere Farbreaktion bei der Färbung mit Anti-Tenascin C, die sich überwiegend auf die Bereiche um die Osteozyten herum konzentrierte. Es zeigten sich zwar wenige gefärbte Bereiche, diese waren jedoch teilweise relativ großflächig. Die geringere Farbreaktion und das Verteilungsmuster könnten Zeichen für eine veränderte Osteoblastendifferenzierung und Mineralisation sein (Böcker et al. 2014).

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-**Carboanhydrase 2** sah man bei den Tieren der Steroidgruppe im Vergleich zur Diät- und Sham-Gruppe eine flächenmäßig geringere Färbung, überwiegend in der Mitte der Trabekel bzw. Kortikalis gelegen und Osteozyten einschließend. Bei dieser Färbung zeigte sich somit keine erhöhte Osteoklastenanzahl oder -aktivität im Vergleich zur Sham-Gruppe, was nicht verwunderlich ist, da eine steroidinduzierte Osteoporose überwiegend durch einen verminderten Knochenaufbau charakterisiert ist.

Auch bei der Färbung mit Anti-**MMP-9** zeigte sich wie bereits bei der Färbung mit Anti-CA2 im Vergleich zur Diät- und Sham-Gruppe eine geringere gefärbte Fläche und somit kein Hinweis auf eine erhöhte Osteoklastenaktivität. Die gefärbten Bereiche waren jedoch auch etwas anders lokalisiert, nämlich zentral in den Trabekeln.

Bei der immunhistochemischen Färbung mit Anti-**MMP-14** konnte MMP-14 ebenfalls in der EZM sowie an den Knochenoberflächen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den anderen Gruppen war die trabekuläre Farbreaktion überwiegend in der EZM und nicht an der Knochenoberfläche lokalisiert.

Typischerweise kommt es bei steroidinduzierter Osteoporose zu einem verminderten Knochenaufbau. Die weitgehend unveränderte Farbreaktion osteokataboler sowie die geringere Anzahl an gefärbten Bereichen osteoanaboler Enzyme passen hierzu und sprechen für einen veränderten Knochenanabolismus.

### ***OVX+S (12M) – steroidinduzierte Osteoporose, Langzeitbehandlung***

Nach zwölf Monaten Standzeit zeigten sich bei den mit Dexamethason behandelten Ratten lichtmikroskopisch eindeutige Kennzeichen einer Osteoporose. Die Trabekel waren dünn, fast ausschließlich kranial und kaudal in der Nähe der Kortikalis zu finden und kaum verzweigt, sodass man fast keine Knotenpunkte, aber teilweise das sogenannte „Knopfphänomen“ sehen konnte. Auffallend waren weiterhin die zahlreichen Fettvakuolen im Knochenmark der Wirbelkörper.

Im Verlauf von 3M zu 12M war bei OVX+S ein signifikanter Anstieg der Osteoblastenaktivität zu verzeichnen, sodass diese nach 12M Standzeit bei den steroidbehandelten Tieren am höchsten war. Dies deutet auf einen erhöhten Knochenumsatz hin, bei lichtmikroskopisch eindeutiger Osteoporose.

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Osteoklastenaktivität von 3M zu 12M bei den mit Dexamthason behandelten Ratten, sodass nach einer Standzeit von 12M eine deutlich erhöhte Osteoklastenaktivität bei OVX+S im Vergleich zur Sham-Gruppe gezeigt werden konnte. Alles in allem zeigte sich also bei der Langzeitbehandlung mit Kortikosteroiden, in diesem Fall Dexamethason, eine lichtmikroskopisch eindeutige Osteoporose mit erhöhtem Knochenumsatz bei Überwiegen des Knochenabbaus.

Nach 12M zeigten sich bei OVX+S im Vergleich zur Sham-Gruppe etwas mehr Biglycan-positive Bereiche, überwiegend an der Trabekeloberfläche und perizellulär gelegen, insgesamt jedoch bei sehr heterogenen Ergebnissen innerhalb der Gruppe.

Die hier beobachteten Ergebnisse mit der erhöhten Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität bei morphologisch eindeutig osteoporotischen Veränderungen sind eigentlich untypisch für eine Behandlung mit Steroiden. Allerdings könnten dies die Folgen der Langzeitbehandlung mit einem kompensatorisch erhöhten Knochenmetabolismus sein.

## **5.6 Betrachtung Studiendesign, Methodik und Ergebnisse**

Normalerweise sollte man bei Gabe einer Mangeldiät an Östrogen-defiziente Tiere zusätzlich eine Gruppe haben, die ebenfalls ovariectomiert wurde, aber keine Diät erhält, um den Einfluss der Hormondefizienz mit dem der Defizienzdiät vergleichen zu können (Duque & Watanabe 2011). Auf eine Gruppe, die nur einer OVX unterzogen worden wäre, wurde in dieser Studie verzichtet, da die erwachsene, ovariectomierte Ratte als das am häufigsten genutzte und etablierte Modell für die postmenopausale Osteoporose gilt und daher bereits mehrfach ausführlich in der Literatur beschrieben wurde. So konnte aus Tierschutzgründen die Anzahl der Tiere geringer gehalten werden.

Es wurde das „mature rat model“ (erwachsene Rattenmodell) genutzt. Alternativ hätte man auch das „aged rat model“ benutzen können, allerdings ist das „mature rat model“ leichter verfügbar und günstiger und da schon mehrfach gezeigt werden konnte, dass das erwachsene Rattenmodell sich als Modell für die postmenopausale Osteoporose des Menschen eignet (French et al. 2008), wurde es als das geeignetere Tiermodell für diese Studie angesehen.

Als Standzeiten wurden 1M, 3M, 12M und 14M nach Ovariectomie gewählt. French et al. 2008 beschreiben, dass die Veränderungen im Knochenmetabolismus einen Monat nach Ovariectomie möglicherweise signifikanter seien als nach zwei Monaten. Hier waren nach Standzeiten von 3M lichtmikroskopische Veränderungen erkennbar, jedoch zeigten sich deutliche Veränderungen im Knochenmetabolismus überwiegend nach einer Langzeitbehandlung (12M bzw. 14M) mit Multidefizienzdiät oder Steroidapplikationen. Daher kann angenommen werden, dass eine Langzeitbehandlung notwendig ist, um eine klinisch relevante Knochenbrüchigkeit zu induzieren. Ursprünglich sollten die Tiere mit einer Standzeit von 14M eine Standzeit von 18M erreichen, was jedoch aus gesundheitlichen Gründen nicht vertretbar war, sodass die Ratten schon nach 14M euthanasiert wurden. Für Folgestudien scheinen Standzeiten von 1M, 3M und 12M sowie möglicherweise noch ein bis zwei Standzeiten dazwischen (z.B. 6M, 9M) als geeignete Untersuchungszeitpunkte.

Für die quantitative Auswertung der enzym- und immunhistochemischen Färbungen wurden jeweils pro Paraffinschnitt 15 Fotos in 40x-Vergrößerung ausgewertet, die jeweils aus der Mitte des Wirbelkörpers stammten. Allerdings zeigte sich durch die Behandlungen mit zunehmender Standzeit eine zentrale Rarefaktion des Trabekelwerks. Dadurch konnten bei diesen Gruppen die Fotos für die Auswertung nicht ganz so zentral im Wirbelkörper geschossen werden wie bei der Sham-Gruppe, da auf den Fotos natürlich Trabekel zu sehen sein sollten, um eine Auswertung überhaupt möglich zu machen.

Um die deutlichen Unterschiede in der Trabekelfläche der behandelten Gruppen und der Sham-Tiere zu relativieren, wurden alle Ergebnisse ins Verhältnis zur Trabekeloberfläche bzw. Trabekelfläche gesetzt. So erhielt man als Ergebnisse relative Werte, die gut untereinander vergleichbar sind.

In der Auswertung wurden die Ergebnisse der Osteoklastenzahl pro Gesamttrabekeloberfläche vernachlässigt, da teilweise auf den Paraffinschnitten nur kleine Bereiche der Osteoklasten angeschnitten waren, die keine sichere Zuordnung zuließen. So war nicht immer eine sichere Bestimmung der Osteoklasten möglich, die generell als große, multinukleäre, TRAP-positive Zellen auf der Trabekeloberfläche definiert waren.

Zur statistischen Auswertung wurden einerseits der Post-Hoc-Test nach Games-Howell, bei dem Mittelwertpaare verglichen werden, sowie der Rangsummentest Mann-Whitney-U benutzt, bei dem zwei Mediane miteinander verglichen werden. Die Rangsummentests haben schwächere Voraussetzungen als die t-Tests, zu denen Games-Howell gehört, und können daher breiter angewendet werden. Da ein Rangsummentest allerdings nur die Reihenfolge der Daten auswertet, ein t-Test

dahingegen jedoch die in den Daten enthaltenen Informationen vollständig ausnutzt, wurde so oft wie möglich eine Auswertung nach Games-Howell durchgeführt. Weiterhin war in diesem Fall auch eine Bestimmung von Konfidenzintervallen und somit von Signifikanzen möglich. (Weiß 2008)

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich die ovariectomisierte Ratte entweder in Kombination mit einer Diät oder Steroidapplikation durchaus als Kleintiermodell für die postmenopausale, senile und steroidinduzierte Osteoporose eignet. Möglicherweise muss noch eine Optimierung der Multidefizienzdiät erfolgen, um so die Anzahl osteomalatischer Bereiche bei Überwiegen des osteoporotisch veränderten Knochens zu reduzieren. Andererseits finden sich in der Literatur Hinweise, dass bei älteren Patienten häufig Mischbilder von Osteoporose und Osteomalazie („Osteoporomalazie“) aufgrund des weit verbreiteten Kalzium- und Vitamin D-Mangels in dieser Altersgruppe zu finden sind (Bartl & Bartl 2011). Daher entsprechen die festgestellten Veränderungen in diesem Tiermodell der senilen Osteoporose sehr wahrscheinlich den tatsächlichen Gegebenheiten in der betroffenen älteren Bevölkerung.

## **6. Ausblick**

Mit Hilfe dieser tierexperimentellen Arbeit und ihrer Ergebnisse konnten viele Aussagen darüber gewonnen werden, worauf man bei einem Osteoporose-induzierenden Kleintiermodell achten muss und durch welche Behandlungen und nach welchen Standzeiten man deutliche osteoporotische Veränderungen erwarten kann. Darüber hinaus konnten neue Erkenntnisse über Veränderungen im Knochenmetabolismus und der Pathophysiologie des systemisch erkrankten Knochens gewonnen werden. Diese Erkenntnisse können genutzt werden, um neu entwickelte Biomaterialien für den osteoporotischen Knochen und neue Ansätze zur Therapie der Osteoporose bzw. Osteoporomalazie zu erproben. Auch kann das etablierte Kleintiermodell zur Testung neuer Osteosynthese-Materialien genutzt werden und die gewonnenen Erkenntnisse auf die Etablierung eines Großtiermodells übertragen werden.

Weitere Erkenntnisse hormoneller Regulationen bzw. von Signalwegen, die einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus haben, könnten ebenfalls zur Etablierung osteoporotischer Tiermodelle genutzt werden.

Eine mögliche Alternative als Kleintiermodell bilden Knock-out Mäuse. Allerdings sind diese deutlich kleiner als Ratten, weshalb sie sich nicht so gut zur Untersuchung der Frakturheilung eignen, sind etwas anfälliger und haben eine höhere Mortalität. Alternativ könnte man darüber nachdenken, ein genetisches Rattenmodell, d.h. Knock-

out Ratten, mit einem osteoporotischen Phänotyp zu entwickeln. Mit Hilfe dieses neuen Osteoporosemodells könnte man weitere Erkenntnisse über Pathogenese und Therapie sowie über Möglichkeiten der Frakturbehandlung bei der Osteoporose gewinnen. Zu den Vorteilen eines genetischen Osteoporosemodells zählen die vielen variablen Faktoren, die bei sonstigen Tiermodellen bedacht werden müssen, wie die Ernährung, Medikamentendosierungen, mit einer Ovariectomie einhergehende Operations- und Narkoserisiken und die Immunsuppression bei Glukokortikoidtherapie, die bei einem genetischen Tiermodell nicht bedacht werden müssen. Allerdings bedarf es viel Recherche und Forschung, um ein geeignetes Knock-out Modell zu entwickeln, das tatsächlich dem gewünschten osteoporotischen Phänotyp entspricht. Da die unterschiedlichen Osteoporoseformen unterschiedliche Charakteristika im Knochenmetabolismus aufweisen, müssten möglicherweise auch differente Modelle geschaffen werden.

Der veränderte Knochenanabolismus mit der erhöhten Osteoblastenaktivität sowie die reduziert-mineralisierte Knochenmatrix gelten als Kennzeichen einer Osteomalazie, die erhöhte Osteoklastenaktivität mit Zunahme der Standzeit als Kennzeichen einer Osteoporose. Daher sollten sich weitere Untersuchungen auf die Differenzierung von mineralisierter gegenüber nicht-mineralisierter Knochengrundsubstanz konzentrieren, um nachweisen zu können, ob eher ein osteoporotischer oder ein osteomalatischer Knochenstatus induziert wurde.

In dieser Arbeit wurde der Knochenmetabolismus mit einem besonderen Augenmerk auf die Funktion der Osteoblasten und Osteoklasten untersucht. In zukünftigen Arbeiten sollte auch die Funktion der Osteozyten, deren Rolle im Knochenmetabolismus nicht unterschätzt werden sollte, weiter analysiert werden. Es sollten weitere Erkenntnisse über die Rolle der Osteozyten bei der Entstehung von Osteoporose und deren Mechanosensibilität gewonnen werden, da mechanische Belastung das Knochenremodelling reguliert. Auch die hier beobachteten Ergebnisse mit teilweise erhöhter Osteoblastenaktivität bei mangelnder Matrixmineralisation sowie veränderten Lokalisationen der Ankerproteine FBN und TNC könnten auf die fehlende mechanische Stimulation bei Osteoporose hindeuten. Weitere Erkenntnisse in dem Zusammenspiel der Knochenzellen, der EZM und der mechanischen Stimulation könnten in Zukunft zu neuen Angriffspunkten in der Prophylaxe und Therapie der systemischen Skeletterkrankung Osteoporose führen.

## Zusammenfassung

Die Osteoporose gewinnt in der alternden Gesellschaft zunehmend an Bedeutung. Die Erkrankung ist gekennzeichnet durch einen unausgewogenen Knochenmetabolismus. Ziel dieser tierexperimentellen Studie war es, die Unterschiede im Knochenmetabolismus im osteoporotischen Knochenstatus der Ratte zu definieren, indem sowohl die zelluläre Aktivität als auch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix analysiert werden sollte.

Es wurden 14 Wochen alte weibliche Sprague-Dawley Ratten verwendet. Die Osteoporoseinduktion erfolgte aus einer Kombination von Multidefizienzdiät mit bilateraler Ovariectomie (OVX+Diät) zur Untersuchung einer postmenopausalen und senilen Osteoporose. Die histologische Auswertung wurde 0M, 1M, 3M, 12M und 14M (M=Monate, n=6 pro Standzeit je Gruppe) nach Osteoporoseinduktion durchgeführt. Als Kontrolle wurden Sham-operierte Ratten verwendet. Weiterhin erhielten einige weitere Tiere Steroidgaben kombiniert mit Ovariectomie (OVX+Steroid) zur Untersuchung einer steroidinduzierten Osteoporose. Diese Ratten wurden nach 3M euthanasiert und die histologischen Ergebnisse mit denen der postmenopausalen bzw. senilen Osteoporose verglichen. Um die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität nachzuweisen, wurden die alkalische Phosphatase und TRAP enzymhistochemisch gefärbt sowie knochenanabole und -katabole EZM-Proteine immunhistochemisch dargestellt. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte mithilfe der Bildbearbeitungssoftwares ImageJ und GIMP, indem die Trabekeloberfläche, die gefärbte Oberfläche sowie die gefärbten Zellen analysiert wurden.

Die ALP-Färbung zeigte nach 3M und 14M in der Gruppe OVX+Diät einen signifikant höheren Anteil der gefärbten Oberfläche pro Trabekeloberfläche als in der Sham-Gruppe und somit eine erhöhte Osteoblastenaktivität, während nach 12 Monaten kein Unterschied zwischen den Gruppen bestand. Bei der Steroidgruppe wurde ein signifikanter Anstieg der Osteoblastenaktivität von 3M zu 12M beobachtet.

Die TRAP-Färbung ergab zu allen Zeitpunkten einen höheren, nicht signifikanten Anteil gefärbter Oberfläche pro gesamter Trabekeloberfläche bei OVX+Diät und OVX+Steroid im Vergleich zur Sham-Gruppe, was für eine erhöhte Osteoklastenaktivität spricht. Tendenziell zeigte sich mit Zunahme der Standzeit eine Zunahme der gefärbten Oberfläche. Ein signifikanter Anstieg der Osteoklastenaktivität konnte von 3M zu 12M bei der Steroidgruppe beobachtet werden.

Bei den immunhistochemischen Färbungen knochenanaboler Enzyme sah man bei OVX+Diät eine höhere Aktivität mit Zunahme der Standzeit sowie teilweise auch veränderte Lokalisationen. Im Gegensatz hierzu zeigten sich bei der Färbung



knochenkataboler Enzyme kaum Aktivitätsunterschiede weder zwischen den Gruppen noch zu verschiedenen Standzeiten.

Insgesamt zeigte sich bei der Diätgruppe überwiegend nach langen Standzeiten ein unausgewogener Knochenumbau, was darauf hinweist, dass eine Langzeitbehandlung notwendig ist, um eine klinisch relevante Knochenbrüchigkeit zu induzieren. Weiterhin ergaben sich aufgrund der Ergebnisse der IHC und Toluidinblaufärbung Hinweise auf einen veränderten Knochenanabolismus mit schlecht mineralisierten Trabekelbereichen bei OVX+D mit Zunahme der Standzeit. Der veränderte Knochenanabolismus mit der erhöhten Osteoblastenaktivität sowie die mindermineralisierte Knochenmatrix gelten als Kennzeichen einer Osteomalazie, die erhöhte Osteoklastenaktivität mit Zunahme der Standzeit als Kennzeichen einer Osteoporose. Da gerade bei älteren Menschen auch häufig aufgrund des weit verbreiteten Vitamin D-Mangels eine sogenannte Osteoporomalazie (Mischform aus Osteoporose und Osteomalazie) vorliegt, ist dieses Tiermodell ein durchaus realistisches Modell für die senile Osteoporose.

Auch bei der Steroidgruppe sah man deutlich osteoporotische Veränderungen, sodass alle Tiermodelle als geeignete Osteoporosemodelle zur weiteren Untersuchung der Pathophysiologie und zur Austestung von Therapieoptionen sowie Optionen zur Unterstützung der Frakturheilung angesehen werden können.

## Summary

Osteoporosis is continually gaining in importance in our ageing society and is marked by an imbalanced bone metabolism. The goal of this animal experimental study was to define the differences in bone metabolism in the osteoporotic bone status of rats by analyzing the cellular activity as well as the composition of the extracellular matrix.

14 week old female Sprague-Dawley rats were used for this purpose. The induction of osteoporosis was achieved through the combination of a multi-deficient-diet and a bilateral ovariectomy (OVX+diet) to further understanding of postmenopausal and senile osteoporosis. The histological testing was conducted 0M, 1M, 3M, 12M and 14M (M=months, n=6 animals per time point) post ovariectomy. As a control group, sham-operated rats were used. Furthermore, some animals received steroid treatment combined with ovariectomy (OVX+steroid) to induce steroid-induced osteoporosis. The latter were euthanized at 3M and the histological results compared with postmenopausal and senile osteoporosis. To identify the activity of osteoblasts and osteoclasts, the alkaline phosphatase and TRAP were stained through enzyme histochemical methods. Osteoanabolic and osteocatabolic ECM-proteins were highlighted through immunohistochemistry. For the histomorphometric analysis, the image processing software ImageJ and GIMP were used to measure the trabecular surface, the stained trabecular surface as well as the stained cells.

For the OVX+diet group, the ALP-staining showed a significantly higher ratio of stained surface to overall trabecular surface at 3M and 14M compared to the sham-group and thus higher osteoblastic activity. However, after 12 months there was no observable difference between the groups. Within the steroid-group, a significant increase in osteoblastic activity was observed between 3M and 12M.

The TRAP-staining resulted in a higher, non-significant proportion of stained surface to total trabecular surface in the diet- and steroid-group compared to the sham-group at each time-point, which indicates increased osteoclastic activity. In general, the stained surface increased over time. Within the steroid-group, osteoclastic activity rose significantly between 3M and 12M.

The immunohistochemical staining of osteoanabolic enzymes showed increased activity at later time-points as well as diverging localization for the diet-group. Opposed to this, the staining of osteocatabolic enzymes showed almost no activity difference between groups and time-points.

Overall, after longer periods of time the diet-group displayed imbalanced bone metabolism, which indicates that long-term treatment is necessary to induce a clinically relevant bone fragility. In addition, the results of the IHC and the toluidine blue staining

indicated a changed bone anabolism with decreasing mineralization of trabecular bone for OVX+diet over time.

The changed bone anabolism, along with increased osteoblastic activity and decreased bone mineralization, are characteristics of osteomalacia, while the increased osteoclastic activity at later time-points is typical for osteoporosis. Since especially the elderly suffer from so called osteoporomalacia (a hybrid of osteoporosis and osteomalacia) due to a common vitamin D-deficiency, this animal model is a realistic model for senile osteoporosis.

The steroid-group displayed obvious osteoporotic changes as well. Therefore, all animal models in question appear to be suitable osteoporosis models to further study the pathophysiology and determine therapy options as well as methods to supplement fracture healing procedures.

**Abkürzungsverzeichnis**

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
APES	3-Aminopropyltriethoxysilan
ATPase	Adenosintriphosphatase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BGN	Biglycan
BGP	bone $\gamma$ -carboxyglutamic-acid-containing protein, Osteocalcin
BMI	Body-Mass-Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Unit
BSA	Bovine Serum Albumin
C, °C	Celsius, Gradeinheit auf der Celsiusskala
CA2	Carboanhydrase 2
c-fos	Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1, Protoonkogen
cm, cm <sup>2</sup>	Zentimeter, Quadratzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
csrc	Tyrosinkinase, Akronym aus "cellular" und "sarcoma"
d	Tag
D	Multidefizienzdiät
DMF	N,N-Dimethylformamid
DVO	Dachverband Osteologie
DXA	Dual X-ray Absorptiometrie
E	Östrogen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHC	Enzymhistochemie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazelluläre Matrix, Extrazellularmatrix
FBN	Fibronectin
FV	Fettvakuole
g	Gramm
GIA	$\gamma$ -Carboxyl-Glutaminsäuregruppen
(G)M-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
H <sup>+</sup>	Wasserstoff

---

HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like Growth Factor
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KM/Km	Knochenmark
L	Lendenwirbel
l	Liter
LWS	Lendenwirbelsäule
M	Monat(e)
m, m <sup>2</sup>	Meter, Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase
MT1-MMP	Membrane Type-1 Matrixmetalloproteinase
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NFκB	Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells, Transkriptionsfaktor
OB, Ob	Osteoblast
OC, Ok, OC Nr	Osteoklast, Osteoklastenanzahl
OCN	Osteocalcin
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin Ligand, RANKL
OVX (+D, +S, +MP)	Ovarektomie, (+Multidefizienzdiät, + Steroide, +Methylprednisolon)
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
pH	potentia Hydrogenii

---

PTH	Parathormon
PU-1	Transkriptionsfaktor PU-1
PYK2	Proline-rich Tyrosine Kinase 2
QCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor- $\kappa$ B Ligand
ROI	Region of Interest
Runx2	Runt-related Transcription Factor 2
S	Steroide
s.c.	subkutan
SD	Standard Deviation, Standardabweichung
SFB	Sonderforschungsbereich
SLRP	Small Leucine-rich Repeat Proteoglycan, kleines leucinreiches Proteoglykan
STA	Stained Trabecular Area, gefärbte Trabekelfläche
STS	Stained Trabecular Surface, gefärbte Trabekeloberfläche
Tab.	Tabelle
TB	Trabecular Bone, trabekulärer Knochen
TBS	Tris-NaCl-Puffer
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor- $\beta$
TNC	Tenascin C
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TP	Time Point, Standzeit
TRAF	TNF Receptor-associated Factor
TRAP	Tartrat-resistente saure Phosphatase
TS	Trabecular Surface, trabekuläre Oberfläche
TTA	Total Trabecular Area, Gesamttrabekelfläche
TTS	Total Trabecular Surface, Gesamttrabekeloberfläche
UV	Ultraviolett
VP	Verdünnungspuffer
WHO	World Health Organization
Wnt-5a	wingless-type MMTV (mouse mammary tumor virus) integration site family, member 5a
WP	Waschpuffer

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Makroskopischer Aufbau eines Röhrenknochens. ....	2
Abbildung 2: Knochenaufbau des kompakten und spongiösen Knochens. ....	4
Abbildung 3: Entwicklung eines Röhrenknochens durch chondrale Ossifikation. ....	5
Abbildung 4: Entstehung von Osteoblasten und Osteoklasten.....	6
Abbildung 5: Lokalisation und Zusammenspiel der verschiedenen Knochenzellen.....	9
Abbildung 6: Osteoklast.....	11
Abbildung 7: Knochenumbau durch BMUs. ....	13
Abbildung 8: Koordination der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität. ....	14
Abbildung 9: Wirbelsäulenveränderungen durch Osteoporose. ....	20
Abbildung 10: DXA-Messung der Lendenwirbelsäule (L1-4).....	21
Abbildung 11: Studiendesign für die enzym- und immunhistochemischen Testungen im osteoporotischen Knochen und bei den Sham-Ratten. ....	28
Abbildung 12: Ovariectomie. ....	29
Abbildung 13: Präparation der Ratten-Wirbelsäule nach der Euthanasie.....	30
Abbildung 14: Beurteilung der Färbeintensität der ALP-Färbung. ....	40
Abbildung 15: Semiautomatisierte Auswertung der Enzymhistochemie mit ImageJ....	41
Abbildung 16: Analyse der gefärbten Trabekelfläche mit GIMP. ....	42
Abbildung 17: Semiautomatisierte Auswertung der IHC mit GIMP.....	43
Abbildung 18: Unterschiede in der trabekulären Beschaffenheit im osteoporotischen Knochen.....	46
Abbildung 19: Quantitative Auswertung der enzymhistochemisch ermittelten Osteoblastenaktivität. ....	48
Abbildung 20: Enzymhistochemische Darstellung der Osteoblastenaktivität.....	49
Abbildung 21: Quantitative Auswertung der enzymhistochemisch ermittelten Osteoklastenaktivität. ....	50
Abbildung 22: Enzymhistochemische Darstellung der Osteoklastenaktivität.....	51
Abbildung 23: Quantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Anti-Biglycan. ....	54
Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung mit Anti-Biglycan.....	55
Abbildung 25: IHC mit Anti-Fibronectin.....	57
Abbildung 26: IHC mit Anti-Osteocalcin.....	59
Abbildung 27: IHC mit Anti-Tenascin C. ....	61
Abbildung 28: IHC mit Anti-Carboanhydrase 2. ....	63
Abbildung 29: IHC mit Anti-MMP-9.....	65
Abbildung 30: IHC mit Anti-MMP-14.....	68

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Medikamentöse Osteoporose-Therapie .....	22
Tabelle 2: Entwässerungsschema.....	31
Tabelle 3: Primär-Antikörper.....	37



**Literaturverzeichnis**

Aaron JE, Francis RM, Peacock M, Makins NB (1989). Contrasting microanatomy of idiopathic and corticosteroid-induced osteoporosis. *Clin Orthop Relat Res*: 294–305.

Aerssens J, van Audekercke R, Talalaj M, Geusens P, Bramm E, Dequeker J (1996). Effect of 1alpha-vitamin D3 and estrogen therapy on cortical bone mechanical properties in the ovariectomized rat model. *Endocrinology* 137: 1358–1364.

Ameye L, Young MF (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology* 12: 107R.

Anh DJ, Dimai HP, Hall SL, Farley JR (1998). Skeletal alkaline phosphatase activity is primarily released from human osteoblasts in an insoluble form, and the net release is inhibited by calcium and skeletal growth factors. *Calcif Tissue Int* 62: 332–340.

Balcerzak M, Hamade E, Le Zhang, Pikula S, Azzar G, Radisson J, Bendorowicz-Pikula J, Buchet R (2003). The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. *Acta Biochim Pol* 50: 1019–1038.

Bartl R, Bartl C, Mutschler W (2003). Diagnostik und Therapie der Osteoporose. Strategie für eine effiziente Prävention von Folgefrakturen. *Unfallchirurg* 106: 526–541.

Bartl R, Gradinger R (2009). Aktuelle Diagnostik und Therapie der Osteoporose auf der Basis der "European Guidance 2008". *Orthopäde* 38: 365-79; quiz 380.

Bartl R, Bartl C, Gradinger R (2009). Medikamenteninduzierte Osteopathien. *Orthopäde* 38: 1245–1261.

Bartl R, Bartl C (2011). *Osteoporose. Prävention ; Diagnostik ; Therapie*. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl Thieme, Stuttgart, New York, NY.

Benninghoff A, Drenckhahn D (2008). *Anatomie*. Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. 17., durchges. Aufl Urban & Schwarzenberg, München [u.a.].

Bi Y, Nielsen KL, Kilts TM, Yoon A, A Karsdal M, Wimer HF, Greenfield EM, Heegaard A, Young MF (2006). Biglycan deficiency increases osteoclast differentiation and activity due to defective osteoblasts. *Bone* 38: 778–786.

Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD, Robey PG (1990). Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38: 1549–1563.

- Black A, Tilmont EM, Handy AM, Scott WW, Shapses SA, Ingram DK, Roth GS, Lane MA (2001). A nonhuman primate model of age-related bone loss: a longitudinal study in male and premenopausal female rhesus monkeys. *Bone* 28: 295–302.
- Böcker W, El Khassawna T, Bauer N, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Schlewitz G, Kampschulte M, Dürselen L, Thormann U, Szalay G, Schnettler R, Langheinrich AC, Heiss C (2014). Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats. *Eur Spine J* 23: 2437–2448.
- Bord S, Ireland D, Beavan S, Compston J (2003). The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 32: 136–141.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337–342.
- Braun J, Pfeilschifter J (2010). Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie der Osteoporose 2010. *Z Rheumatol* 69: 327–339.
- Cao Y, Mori S, Mashiba T, Westmore MS, Ma L, Sato M, Akiyama T, Shi L, Komatsubara S, Miyamoto K, Norimatsu H (2002). Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 17: 2237–2246.
- Cerroni AM, Tomlinson GA, Turnquist JE, Gryn timer MD (2000). Bone mineral density, osteopenia, and osteoporosis in the rhesus macaques of Cayo Santiago. *Am J Phys Anthropol* 113: 389–410.
- Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, Meunier PJ (1997). Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 7: 439–443.
- Chen C, Liu M, Wang M, Chen C (2007). Effects of Aging and Dietary Antler Supplementation on the Calcium-Regulating Hormones and Bone Status in Ovariectomized SAMP8 Mice. *Chin J Physiol*: 308–314.
- Chen J, He J, Zhen S, Huang L (2012). OPG inhibits gene expression of RANK and CAll in mouse osteoclast-like cell. *Rheumatol Int* 32: 3993–3998.
- Chen X, Fisher LW, Robey PG, Young MF (2004). The small leucine-rich proteoglycan biglycan modulates BMP-4-induced osteoblast differentiation. *FASEB J* 18: 948–958.

- Chiquet M, Sarasa-Renedo A, Tunç-Civelek V (2004). Induction of tenascin-C by cyclic tensile strain versus growth factors: distinct contributions by Rho/ROCK and MAPK signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 1693: 193–204.
- Chiquet-Ehrismann R, Mackie EJ, Pearson CA, Sakakura T (1986). Tenascin: an extracellular matrix protein involved in tissue interactions during fetal development and oncogenesis. *Cell* 47: 131–139.
- Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M (2003). Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress. *J Pathol* 200: 488–499.
- Chiquet-Ehrismann R, Tucker RP (2004). Connective tissues: signalling by tenascins. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1085–1089.
- Chmielnicka M, Woźniacka A, Torzecka JD (2014). The influence of corticosteroid treatment on the OPG/RANK/RANKL pathway and osteocalcin in patients with pemphigus. *Postepy Dermatol Alergol* 31: 281–288.
- Consensus Development Conference (1993). Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 94: 646–650.
- Costa G, Leite D, do Prado R, Silveira V, Carvalho Y (2009). Effect of low-calcium diet and grind diet on bone turnover of ovariectomized female rats. *Med Oral*: e497.
- Dachverband Osteologie e.V. DVO-Leitlinie 2009 zur Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose bei Erwachsenen. Langfassung.
- Dospil A, Helferich S, Horn F (2005). *Biochemie des Menschen*. Das Lehrbuch für das Medizinstudium. 3., grundlegend überarb. und erw. Aufl Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Douglas T, Heinemann S, Bierbaum S, Scharnweber D, Worch H (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules* 7: 2388–2393.
- Ducy P, Desbois C, Boyce B, Pinero G, Story B, Dunstan C, Smith E, Bonadio J, Goldstein S, Gundberg C, Bradley A, Karsenty G (1996). Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice. *Nature* 382: 448–452.
- Duque G, Watanabe K (2011). *Osteoporosis research*. Animal models. Springer, London, New York.
- Egermann M, Goldhahn J, Schneider E (2005). Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 16 Suppl 2: S129-38.
- El Khassawna T, Böcker W, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Kampschulte M, Thormann U, Henss A, Rohnke M, Bauer N, Müller R, Deutsch A, Ignatius A,

- Dürselen L, Langheinrich A, Lips KS, Schnettler R, Heiss C (2015). Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. *Histochem Cell Biol* 144: 491–507.
- Faloni, Ana Paula de Souza, Sasso-Cerri E, Rocha, Fernanda Regina Godoy, Katchburian E, Cerri PS (2012). Structural and functional changes in the alveolar bone osteoclasts of estrogen-treated rats. *J Anat* 220: 77–85.
- Freissmuth M, Offermanns S, Böhm S (2012). *Pharmakologie & Toxikologie*. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- French DL, Muir JM, Webber CE (2008). The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: an assessment of the bone sparing effects of curcumin. *Phytomedicine* 15: 1069–1078.
- Fu Y, Gu J, Zhang Y, Tong X, Zhao H, Yuan Y, Liu X, Bian J, Liu Z (2013). Osteoprotegerin influences the bone resorption activity of osteoclasts. *Int J Mol Med* 31: 1411–1417.
- Fujisaki K, Tanabe N, Suzuki N, Kawato T, Takeichi O, Tsuzukibashi O, Makimura M, Ito K, Maeno M (2007). Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci* 80: 1311–1318.
- Globus RK, Doty SB, Lull JC, Holmuhamedov E, Humphries MJ, Damsky CH (1998). Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J Cell Sci* 111 (Pt 10): 1385–1393.
- Godschalk MF, Downs RW (1988). Effect of short-term glucocorticoids on serum osteocalcin in healthy young men. *J Bone Miner Res* 3: 113–115.
- Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989). Osteocalcin and matrix Gla protein: vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69: 990–1047.
- Häussler B, Gothe H, Mangiapane S, Glaeske G, Pientka L, Felsenberg D (2006). Versorgung von Osteoporose-Patienten in Deutschland. Ergebnisse der BoneEVA-Studie. *Dtsch Arztebl* 103: A-2542.
- Heine H (2014). *Lehrbuch der biologischen Medizin*. Grundlagen und Extrazelluläre Matrix. 4., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage Karl F. Haug, Stuttgart.

Herold G (2012). *Innere Medizin 2012*. Eine vorlesungsorientierte Darstellung ; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Selbstverl, Köln.

Hessle L, Johnson KA, Anderson HC, Narisawa S, Sali A, Goding JW, Terkeltaub R, Millan JL (2002). Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 99: 9445–9449.

Hill PA, Murphy G, Docherty AJ, Hembry RM, Millican TA, Reynolds JJ, Meikle MC (1994). The effects of selective inhibitors of matrix metalloproteinases (MMPs) on bone resorption and the identification of MMPs and TIMP-1 in isolated osteoclasts. *J. Cell Sci* 107 (Pt 11): 3055–3064.

Hofbauer LC, Gori F, Riggs BL, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Khosla S (1999). Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology* 140: 4382–4389.

Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp, Anne E (2005). Prevalence of Vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 3215–3224.

Holick MF, Chen TC (2008). Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 87: 1080S-6S.

Holmbeck K, Bianco P, Caterina J, Yamada S, Kromer M, Kuznetsov SA, Mankani M, Gehron Robey P, Poole A, Pidoux I, Ward JM, Birkedal-Hansen H (1999). MT1-MMP-Deficient Mice Develop Dwarfism, Osteopenia, Arthritis, and Connective Tissue Disease due to Inadequate Collagen Turnover. *Cell* 99: 81–92.

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, Chrysovergis K, Yamada S, Birkedal-Hansen H, Poole AR (2005). The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *J Cell Sci* 118: 147–156.

Hozuki T, Imai T, Tsuda E, Matsumura A, Yamamoto D, Toyoshima T, Suzuki S, Yamauchi R, Hayashi T, Hisahara S, Shimohama S (2010). Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to risedronate monotherapy and combined therapy with vitamin K(2) in corticosteroid-treated patients: a pilot study. *Intern Med* 49: 371–376.

- Hui M, Tenenbaum HC (1998). New face of an old enzyme: alkaline phosphatase may contribute to human tissue aging by inducing tissue hardening and calcification. *Anat Rec* 253: 91–94.
- Institute of Laboratory Animal Resources (U.S.) (1981). *Mammalian models for research on aging*. National Academy Press, Washington, D.C.
- Ishida M, Amano S (2004). Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab* 22: 415–429.
- Ivaska KK, Hentunen TA, Vääräniemi J, Ylipahkala H, Pettersson K, Väänänen HK (2004). Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *J Biol Chem* 279: 18361–18369.
- Janckila AJ, Takahashi K, Sun SZ, Yam LT (2001). Tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b as serum marker for osteoclastic activity. *Clin Chem* 47: 74–80.
- Jee WS, Yao W (2001). Overview: animal models of osteopenia and osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1: 193–207.
- Kalu DN, Liu CC, Hardin RR, Hollis BW (1989). The aged rat model of ovarian hormone deficiency bone loss. *Endocrinology* 124: 7–16.
- Kalu DN (1991). The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15: 175–191.
- Kanis JA, Johnell O, Oden A, Sernbo I, Redlund-Johnell I, Dawson A, Laet C de, Jonsson B (2000). Long-Term Risk of Osteoporotic Fracture in Malmö. *Osteoporos Int* 11: 669–674.
- Kavukcuoglu NB, Patterson-Buckendahl P, Mann AB (2009). Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones. *J Mech Behav Biomed Mater* 2: 348–354.
- Klein S, Jessel S, Linder R, Verheyen F, Häussler B (2014). *Frakturen und Versorgungskosten bei Osteoporose: Analyse von Krankenkassen-Routinedaten im Rahmen der Bone Evaluation Study (BEST)*.
- Kogawa M, Wijenayaka AR, Ormsby RT, Thomas GP, Anderson PH, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ (2013). Sclerostin regulates release of bone mineral by osteocytes by induction of carbonic anhydrase 2. *J Bone Miner Res* 28: 2436–2448.
- Lacey D, Timms E, Tan H, Kelley M, Dunstan C, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian Y,

Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle W (1998). Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell* 93: 165–176.

Lang G (2013). *Histotechnik*. Springer Vienna, Vienna.

Lill CA, Gerlach UV, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E (2002). Bone changes due to glucocorticoid application in an ovariectomized animal model for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int* 13: 407–414.

Linsley C, Wu B, Tawil B (2013). The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 19: 1416–1423.

Lüllmann-Rauch R (2006). *Taschenlehrbuch Histologie*. 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl Thieme, Stuttgart [u.a.].

Mackie EJ, Thesleff I, Chiquet-Ehrismann R (1987). Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *J Cell Biol* 105: 2569–2579.

Mackie EJ, Ramsey S (1996). Modulation of osteoblast behaviour by tenascin. *J Cell Sci* 109 (Pt 6): 1597–1604.

Mathews S, Bhonde R, Gupta PK, Totey S (2012). Extracellular matrix protein mediated regulation of the osteoblast differentiation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Differentiation* 84: 185–192.

Melton LJ, Chrischilles EA, Cooper C, Lane AW, Riggs BL (2005). How many women have osteoporosis? JBMR Anniversary Classic. JBMR, Volume 7, Number 9, 1992. *J Bone Miner Res* 20: 886–892.

Miao D, Bai X, Panda D, McKee M, Karaplis A, Goltzman D (2001). Osteomalacia in hyp mice is associated with abnormal pth expression and with altered bone matrix protein expression and deposition. *Endocrinology* 142: 926–939.

Minuth WW, Strehl R, Schumacher K (2012). *Zukunftstechnologie Tissue Engineering*. Von der Zellbiologie zum künstlichen Gewebe. 1., Auflage Wiley-VCH, Weinheim.

Morgan JM, Wong A, Yellowley CE, Genetos DC (2011). Regulation of tenascin expression in bone. *J Cell Biochem* 112: 3354–3363.

Moriya Y, Ito K, Murai S (1998). Effects of experimental osteoporosis on alveolar bone loss in rats. *J Oral Sci* 40: 171–175.

- Müller M (2011). *Chirurgie für Studium und Praxis*. Unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen 2012/13. 11. Aufl Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach.
- Murphy G, Nagase H (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med* 29: 290–308.
- Narisawa S, Fröhlander N, Millán JL (1997). Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia. *Dev Dyn* 208: 432–446.
- Netter FH, Böttcher T (2001). *Netters Orthopädie*. Thieme, Stuttgart.
- Neve A, Corrado A, Cantatore FP (2013). Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. *J Cell Physiol* 228: 1149–1153.
- Nielsen KL, Allen MR, Bloomfield SA, Andersen TL, Chen X, Poulsen HS, Young MF, Heegaard A (2003). Biglycan deficiency interferes with ovariectomy-induced bone loss. *J Bone Miner Res* 18: 2152–2158.
- O'Brien CA, Jia D, Plotkin LI, Bellido T, Powers CC, Stewart SA, Manolagas SC, Weinstein RS (2004). Glucocorticoids act directly on osteoblasts and osteocytes to induce their apoptosis and reduce bone formation and strength. *Endocrinology* 145: 1835–1841.
- Orimo H, Shimada T (2008). The role of tissue-nonspecific alkaline phosphatase in the phosphate-induced activation of alkaline phosphatase and mineralization in SaOS-2 human osteoblast-like cells. *Mol Cell Biochem* 315: 51–60.
- Parisuthiman D, Mochida Y, Duarte WR, Yamauchi M (2005). Biglycan modulates osteoblast differentiation and matrix mineralization. *J Bone Miner Res* 20: 1878–1886.
- Poser JW, Esch FS, Ling NC, Price PA (1980). Isolation and sequence of the vitamin K-dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem* 255: 8685–8691.
- Reid DM (2011). *Handbook of Osteoporosis*. Springer Healthcare, London.
- Reuss-Borst MA (2014). Metabolische Knochenkrankheit Osteomalazie. *Z Rheumatol* 73: 316–322.
- Rodgers JB, Monier-Faugere MC, Malluche H (1993). Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function. *Bone* 14: 369–377.
- Sambrook P, Cooper C (2006). Osteoporosis. *Lancet* 367: 2010–2018.



- Sasano Y, Li HC, Zhu JX, Imanaka-Yoshida K, Mizoguchi I, Kagayama M (2000). Immunohistochemical localization of type I collagen, fibronectin and tenascin C during embryonic osteogenesis in the dentary of mandibles and tibiae in rats. *Histochem J* 32: 591–598.
- Scarnecchia L, Minisola S, Pacitti MT, Carnevale V, Romagnoli E, Rosso R, Mazzuoli GF (1991). Clinical usefulness of serum tartrate-resistant acid phosphatase activity determination to evaluate bone turnover. *Scand J Clin Lab Invest* 51: 517–524.
- Schiebler TH (2005). *Anatomie*. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskatalogs. 9., vollst. überarb. Aufl Springer, Heidelberg.
- Shao J, Wang Z, Yang T, Ying H, Zhang Y, Liu S (2015). Bone Regulates Glucose Metabolism as an Endocrine Organ through Osteocalcin. *Int J Endocrinol* 2015: 967673.
- Sternlicht MD, Werb Z (2001). How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 463–516.
- Stöcker W, Grams F, Reinemer P, Bode W, Baumann U, Gomis-Rüth F, McKay DB (1995). The metzincins - Topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a super family of zinc-peptidases. *Protein Sci* 4: 823–840.
- Sundaram K, Nishimura R, Senn J, Youssef RF, London SD, Reddy SV (2007). RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation. *Exp Cell Res* 313: 168–178.
- Takino T, Watanabe Y, Matsui M, Miyamori H, Kudo T, Seiki M, Sato H (2006). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase modulates focal adhesion stability and cell migration. *Exp Cell Res* 312: 1381–1389.
- Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ (1995). FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone* 17: S125.
- Turner AS (2001). Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 1: 66–81.
- Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (1998). Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest* 102: 274–282.

- Weinstein RS, Chen J, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC (2002). Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest* 109: 1041–1048.
- Weiß C (2008). *Basiswissen medizinische Statistik*. ; mit 15 Tabellen. 4., überarb. Aufl Springer Medizin, Heidelberg.
- Welsch U, Deller T (2010). *Lehrbuch Histologie*. 3. Aufl Elsevier, Urban & Fischer, München.
- Wennemuth G, Albrecht M (2012). *Taschenatlas Histologie*. Urban & Fischer, Elsevier, München.
- World Health Organization (2003). *Prevention and management of osteoporosis*. Report of a WHO Scientific Group. World Health Organization, Geneva.
- Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA (1985). Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 37: 324–328.
- Wronski TJ, Cintrón M, Dann LM (1988). Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 43: 179–183.
- Wronski TJ, Dann LM, Scott KS, Cintrón M (1989). Long-term effects of ovariectomy and aging on the rat skeleton. *Calcif Tissue Int* 45: 360–366.
- Wülker N (2010). *Taschenlehrbuch Orthopädie und Unfallchirurgie*. 2. Aufl Thieme, Stuttgart, New York, NY.
- Xu T, Bianco P, Fisher LW, Longenecker G, Smith E, Goldstein S, Bonadio J, Boskey A, Heegaard AM, Sommer B, Satomura K, Dominguez P, Zhao C, Kulkarni AB, Robey PG, Young MF (1998). Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice. *Nat Genet* 20: 78–82.
- Yan Y, Gong Y, Guo Y, Lv Q, Guo C, Zhuang Y, Zhang Y, Li R, Zhang X (2012). Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. *PLoS One* 7: e35709.
- Zhang L, Kahn, Cyril J F, Chen H, Tran N, Wang X (2008). Effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: orientation and expressions of collagen types I and III and tenascin-C. *Cell Biol Int* 32: 344–352.
- Zhao H, Cai G, Du J, Xia Z, Wang L, Zhu T (1997). Expression of matrix metalloproteinase-9 mRNA in osteoporotic bone tissues. *J. Tongji Med. Univ.* 17: 28–31.

---

## **Ehrenwörtliche Erklärung**

### **Erklärung zur Dissertation**

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

---

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß für die Möglichkeit zur Promotion und Mitarbeit in einem solch großen, transregionalen Projekt (SFB/TTR 79) wie diesem sowie die gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Thaqif El Khassawna bedanken, der mich jederzeit mit guten Ratschlägen unterstützt hat und von dem ich sehr viel lernen konnte.

Vielen Dank auch an Dr. Gudrun Schlewitz für die Betreuung während der Promotion.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen bedanken für die freundliche Aufnahme in das Team und die Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragen. Mein Dank gilt insbesondere Annette Stengel und Julia Sparer sowie Frau Prof. Dr. Katrin Lips.

Ich bedanke mich bei dem gesamten Team des Sonderforschungsbereiches / Transregio 79 für die gute Zusammenarbeit sowie den regen Wissens- und Erkenntnisaustausch. Insbesondere vielen Dank an alle Mitarbeiter des Teilprojektes T1 für die tolle Zusammenarbeit und die schöne Zeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung während meiner Promotion bedanken.